

**UNTERSUCHUNG VON
BASALMEMBRANKOLLAGEN AUS
MENSCHLICHER PLAZENTA**

**Isolierung und Charakterisierung von
durch Spaltung mit Pepsin erhaltener Fragmente**

Anton Rauter

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548305_0061

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

UNTERSUCHUNG VON BASALMEMBRANKOLLAGEN AUS
MENSCHLICHER PLAZENTA

Isolierung und Charakterisierung von durch
Spaltung mit Pepsin erhaltener Fragmente



vorgelegt von Anton Rauter
München 1980

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 1980



Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried/München, Abteilung Bindegewebsforschung, Leitung Professor Dr. Klaus Kühn, in der Zeit von Oktober 1977 bis November 1979 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn danke ich herzlich für die Anregung des Themas und seine wissenschaftliche Anleitung, sowie für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Gespräche.

Herrn Dr. Robert Glanville danke ich herzlich für seine laufende Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft und für viele Anregungen und Diskussionen. Den Mitarbeitern seines Arbeitskreises danke ich für die vielen Ratschläge und die ständige Hilfsbereitschaft.

Für die Ausführung der immunologischen Untersuchungen danke ich den Herren Dr. Klaus von der Mark, Dr. Juha Risteli und Dr. Rupert Timpl.

Mit Erlaubnis der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT München wurde über Erkennt-
nisse und Details dieser Arbeit öffentlich berichtet:

Collagen and Mucopolysacchadride Clubs, Cambridge,
March 30-31, 1978

Isolation and Characterisation of Three α Chains from
Human Placental Type IV Collagen.

Glanville R. and Rauter A.

Gordon Research Conferences, Collagen - Structural Macro-
moleculs

New Hampton, New Hampshire, July 2-7, 1978

6th Colloquium of the Federation of European Connective Tissue
Clubs, Paris, August 28-30, 1978

Biochemistry of Normal and Pathological Connective Tissues,
Isolation and Characterisation of the Cyanogen Bromide
Peptides from Human Placental Type IV Collagen α Chain.
Rauter A. and Glanville R.

Glanville R.W., Rauter, A. and Fietzek, P.P.

Isolation and Characterisation of a Native Placental
Basement-Membrane Collagen and Its Component α Chains
Eur. J. Biochem. 95, 383-389 (1979).

Rauter, A., Glanville, R.W. and Kühn, K.

Pepsin Fragments of Human Placental Type IV Collagen
in preparation.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
Bindegewebe	1
1.1 Interstitielles Kollagen	2
Biosynthese der interstitiellen Kollagene	
1.2 Basalmembrankollagen	8
Basalmembranen	8
Funktion der Basalmembran	10
Struktur und Aufbau der Basalmembran	
Nichtkollagene Komponenten in Basalmembranen	14
Bedeutung der Basalmembran in medizinischer Sicht	15
AB Kollagen	15
2. AUFGABENSTELLUNG	18
3. ERGEBNISSE	20
3.1 In Lösung bringen von nativem Basalmembrankollagen durch limitierten Pepsinabbau	20
3.1.1 Kinetische Untersuchung des 2. Pepsinabbaus	25
3.2 Untersuchung und Charakterisierung des nativen Basalmembrankollagens	28
3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung von long-spacing-segment Kristalliten	30
3.3 Untersuchung und Charakterisierung der Peptidketten nach Denaturierung des Basalmembrankollagens	33

	Seite
3.3.1 Chromatographische Auftrennung von kleineren Pepsinfragmenten und deren Charakterisierung	42
4. IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	51
4.1 Immunologische Vergleiche von nativem Typ IV Kollagen mit interstitiellem Kollagen	51
4.2 Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern gegen natives Basalmembrankollagen	53
4.3 Immunologische Untersuchungen von α (IV) und α' (IV) Ketten	56
5. SEQUENZUNTERSUCHUNGEN DER α (IV) KETTE	59
5.1 Spaltung mit Bromcyan	59
5.2 Auftrennung der Bromcyanpeptide durch CMC-Chromatographie	61
5.3 Auftrennung der Bromcyanpeptide durch Gelchromatographie	66
6. DISKUSSION	77
7. ZUSAMMENFASSUNG	83
8. EXPERIMENTELLER TEIL	86
8.1 Ausgangsmaterial	86
8.2 Isolierung von Basalmembrankollagen	86
8.3 Chromatographische Verfahren	89
8.3.1 Ionenaustauschchromatographie	89
8.3.2 Molekularsiebchromatographie	91

	Seite
8.4 Polyacrylamid-Elektrophorese in SDS	92
8.4.1 SDS-Diskelektrophorese	92
8.4.2 SDS-Plattengelelektrophorese	93
8.5 Präparation von Segment-long-spacing Kristalliten (36)	94
8.6 Molekulargewichtsbestimmung	94
8.6.1 Gelchromatographie	94
8.6.2 SDS-Diskelektrophorese	95
8.7 Sequenzierung (64,65)	95
8.8 Bromcyanspaltung	96
8.9 Aminosäureanalysen	97
8.10 Bestimmung von Hydroxylysin und Hydroxylysinglykosiden	97

9. LITERATUR

10. LEBENSLAUF

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMK	Basalmembrankollagen
BrCN	Bromcyan
CB-Peptide	Bromcyanpeptide
CMC	Carboxymethylcellulose
D, kD	Dalton, Kilo-Dalton
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
PC	Phosphocellulose
PTH-	Phenylthiohydantoin-
Quadrol	N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)-äthylendiamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLS	Molekülzusammenlagerung (segment-long-spacing)
TEMED	Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

Bindegewebe kommt in einer Vielfalt von verschiedenen Formen im tierischen Organismus vor. Die biomechanischen Anforderungen, denen Bindegewebe entsprechen muß, sind sehr unterschiedlich und hängen davon ab, welche physiologische Funktion es zu erfüllen hat. Sehnen, die Muskelkräfte (Zugkräfte) auf das Skelett zu übertragen haben, zeigen einen seilartigen Aufbau und bestehen aus parallelen verdrehten Faserbündeln. Der hyaline Knorpel, der den Gelenken eine glatte, widerstandsfähige Oberfläche gibt und eine reibungslose Bewegung der Gelenke ermöglicht, muß enormen Drücken widerstehen können. Retikulines Gewebe, das als feines, verästeltes Faser Netzwerk die Organe umhüllt und durchzieht, hat die Aufgabe zu stützen und zu verfestigen.

Trotz dieser speziellen Erscheinungsformen mit den verschiedenen physikalischen Eigenschaften sind alle Bindegewebe aus den gleichen Elementen aufgebaut, und zwar aus Zellen, Proteoglykanen und den Faserproteinen Kollagen und Elastin.

Die verschiedenen Eigenschaften werden wesentlich durch die makromolekulare Organisation und durch den Einsatz verschiedener Kollagentypen durch den Organismus bestimmt.

In den letzten Jahren sind eine Reihe von genetisch ver-

schiedenen Typen von Kollagenmolekülen gefunden und deren Primärstruktur untersucht worden.

Man unterscheidet heute hinsichtlich morphologischer und chemischer Kriterien zwei verschiedene Familien von Kollagenen, nämlich interstitielles Kollagen und Basalmembrankollagen.

1.1 Interstitielles Kollagen

Am längsten bekannt und am besten untersucht ist das Typ I Kollagen, der Hauptbestandteil von Haut, Sehnen und Knochen. Die chemische Charakterisierung des Moleküls und seiner Polypeptidketten führten zur Erkenntnis, daß das Molekül aus zwei gleichen ($\alpha 1$) und einer verschiedenen, aber deutlich homologen Kette ($\alpha 2$) zusammengesetzt ist (1,2). Dagegen enthält das Molekül des Typ II Kollagens, aus dem der hyaline Knorpel aufgebaut ist, drei identische Ketten. Das gleiche gilt für das Molekül des Typ III Kollagens (3,4), welches u.a. das von den Histologen als Retikulin bezeichnete Faser Netzwerk bildet, und das, wie z.B. in der Haut und in den Gefäßwänden, oft mit Typ I Kollagen gemeinsam auftritt.

Typ I, II und III Kollagen sind einander ähnlich aufgebaut, und die Sequenz ihrer α Ketten ist weitgehend homolog. Genauere Untersuchungen der Aminosäuresequenz ergaben jedoch

charakteristische Unterschiede in der Verteilung der polaren und hydrophoben Aminosäuren, gerade bei den Resten, welche für die Aggregation der Moleküle zu den Fibrillen verantwortlich sind (5).

Der Grundbaustein der Kollagenfibrillen ist das Kollagenmolekül. Das stäbchenförmige Molekül mit einer Länge von 2900 Å und einem Durchmesser von 14 Å, sowie einem Molekulargewicht von 285.000, findet man als kleinste funktionelle Einheit des Kollagens im extrazellulären Raum des Bindegewebes. Es besteht aus drei, etwa 1050 Aminosäurereste langen Peptidketten, den α Ketten. Mit Ausnahme von kurzen Bereichen an den beiden Enden kann die α Kette durch folgende allgemeine molekulare Formel definiert werden: $(\text{Gly-X-Y})_{338}$, wobei X und Y mit allen bekannten Aminosäuren besetzt sein können. Die einzelnen α Ketten liegen als linksgängige Polyprolinhelices vor und sind um eine gemeinsame Achse zu einer rechtsgängigen Tripelhelix verdrillt. Für die Zusammenlagerung der α Ketten zum Kollagenmolekül ist es wichtig, daß die kleinste Aminosäure Glycin an jeder 3. Stelle zu finden ist, da nur unter dieser Bedingung die 3 Einzelstränge sich im Zentrum der Tripelhelix näherkommen können. Von größter Wichtigkeit für die Stabilität ist ferner die Anwesenheit von Prolin und Hydroxyprolin, die beide als cyclische Iminosäuren die Rotation der Peptidkette einschränken (6,7).

Diese Kollagenmoleküle treten dann zu den Fibrillen zusammen, die im Elektronenmikroskop ein charakteristisches Querstreifungsmuster von 600-700 Å zeigen. In ihnen sind die Moleküle um den Abstand $D=670 \text{ Å}$ ($= 234$ Aminosäurereste) gegeneinander versetzt angeordnet.

Diese Zusammenlagerung wird durch die Aminosäuresequenz gesteuert. Die polaren, geladenen Aminosäuren wie Arginin, Lysin, Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie die großen hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Methionin sind entlang der α Kette so verteilt, daß es bei einer axialen Versetzung der Moleküle um D zu einer maximalen polaren und hydrophoben Interaktion zwischen benachbarten Molekülen kommt (5,8).

Wie die weitere makromolekulare Organisation der Fibrillen zu parallelen Faserbündeln oder zu den verschieden geformten dreidimensionalen Geflechten und Netzwerken abläuft, ist weitgehend unbekannt, doch dürfte hier anderen Bindegewebskomponenten (sauren Proteoglykanen) eine steuernde Rolle zufallen.

Biosynthese der interstitiellen Kollagene

Die Biosynthese von Kollagen kann in zwei Abschnitte geteilt werden, und zwar in den intrazellulären Vorgang der Synthese, Modifikation und Sekretion der Prokollagenmole-

küle und in den zweiten Schritt der extrazellulären Umwandlung von Prokollagen in Kollagen und dessen Einbau in eine stabile quervernetzte Kollagenfibrille (9,10).

Die Pro- α Ketten werden, wie viele der Proteine, die aus der Zelle ausgeschleust werden (11), mit zusätzlichen Pre- oder Signalsequenzen ("Leader"-Sequenzen) synthetisiert. Da diese Presequenzen in vivo sofort abgespalten werden, gelang der Nachweis dieser Peptide erst kürzlich durch Untersuchungen der Translation von Kollagen-mRNA in einem zellfreien System (12,13).

Diese zusätzlichen Peptide am N-Terminus bestehen aus etwa 100 Aminosäureresten (Prepro- α 1(I)), sind hydrophob und sind für die Einschleusung der wachsenden Peptidkette in die Zisternen des endoplasmatischen Reticulums, wo schließlich die posttranslationalen Modifikationen stattfinden, verantwortlich.

Die Pro- α Ketten enthalten am N- und am C-terminalen Ende nichthelikale globuläre Peptide. Das N-terminale Segment hat ein Molekulargewicht von 15.000 - 20.000 und das C-terminale von 33.000 - 37.000 D (10), wonach sich für die Pro- α Ketten ein Molekulargewicht von ca. 145.000 - 155.000 errechnet.

Noch bevor sich je 3 Pro- α Ketten zu einem tripelhelikalen Molekül zusammenschließen, laufen einige enzymatisch katalysierte Reaktionen ab. Dies sind die Hydroxylierung bestimmter Prolin- und Lysinreste durch Prolyl- bzw. Lysylhydroxylase sowie die sich anschließende Glykosylierung einiger Hydroxylysinreste mit Hilfe der Glukosyl- und Galaktosyltransferase.

Nach welchem Mechanismus die 3 α Ketten die richtige Lage zueinander finden, um eine Tripelhelix bilden zu können, ist noch nicht geklärt, doch nimmt man an, daß die C-terminalen Prokollagenpeptide eine wichtige Rolle dabei spielen. Beim Transport des fertiggestellten Prokollagenmoleküls in den extrazellulären Raum erfolgt dann der Übergang zu dem funktionsfähigen Kollagenmolekül, wobei spezifische Prokollagenpeptidasen das C-terminale und das N-terminale Peptid abspalten. Das Molekül besitzt nun die Fähigkeit zu Fibrillen zu aggregieren.

Nachdem die Moleküle in den Fibrillenverband eingebaut sind, erfolgt erst der letzte Schritt der posttranslationalen Modifikation. An den Amino- und Carboxylenden der α Ketten befinden sich kurze nichthelikale Bereiche. Sie enthalten jeweils einen Lysin- oder Hydroxylysinrest, der durch oxidative Desaminierung (Lysyloxidase) in den entsprechenden Aldehyd umgewandelt wird, der dann mit Lysin- und Hydroxy-

lysinstoffen (im helikalen Bereich) benachbarter Moleküle kovalente Quervernetzungen (Schiff'sche Basen) ausbilden kann. Das Auftreten von intermolekularen Quervernetzungen (14) macht die Fibrille unlöslich, bewirkt die Stabilität des Fibrillenverbandes und beeinflußt wesentlich die mechanischen Eigenschaften des Bindegewebes.

Wie schon erwähnt, scheint der Organismus die Möglichkeit zu haben, die biomechanischen Eigenschaften des Bindegewebes durch den Einsatz der verschiedenen Kollagentypen zu regulieren (15). So enthält z.B. Haut von Erwachsenen Typ I und III Kollagen im Verhältnis von 9:1, während in der mittleren Schicht der Aortenwand das Verhältnis 6:4 beträgt. Kommt es nun aufgrund von krankhaften Veränderungen der Zelle zu Verschiebungen der Verhältnisse, so ändern sich auch die Eigenschaften der Bindegewebe. Bei Patienten mit dem MARFAN-Syndrom führt ein gesteigerter Typ III-Gehalt zum Verlust der Festigkeit der Aortenwand, so daß das überelastische Gewebe zur Ausbildung von Aneurysmen tendiert. Patienten mit dem EHLERS-DANLOS-Syndrom IV besitzen hingegen kein Typ III Kollagen, was zur Folge hat, daß die Haut pergamentartig erscheint und die unelastische und unflexible Aortenwand zu Rupturen neigt.

Bei der Osteoarthritis (15), einer Erkrankung des Knorpels, wird die Typ II Synthese, möglicherweise unter Mitwirkung

der Proteoglykane, umgeschaltet auf Synthese von Typ I Kollagen. Über die molekularen Ursachen dieser Erscheinungen ist noch wenig bekannt.

1.2 Basalmembrankollagen

Basalmembranen (16,17)

Neben dem interstitiellen Bindegewebe gibt es noch ein anderes Gewebe, welches Kollagen enthält, die Basalmembranen. Sie haben eine völlig andere Funktion und Struktur und sind im Organismus weit verbreitet. Mit dem Lichtmikroskop ließ sich mit der Perjodsäure-Schiff-Anfärbemethode die Membran unter dem Epithel und um Muskelfasern sichtbar machen, sie wurde als Basalmembran bzw. basal lamina bezeichnet.

Durch die Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß Basalmembranen überall dort gefunden werden, wo Zellen (nicht Bindegewebszellen) auf Bindegewebsmatrix treffen.

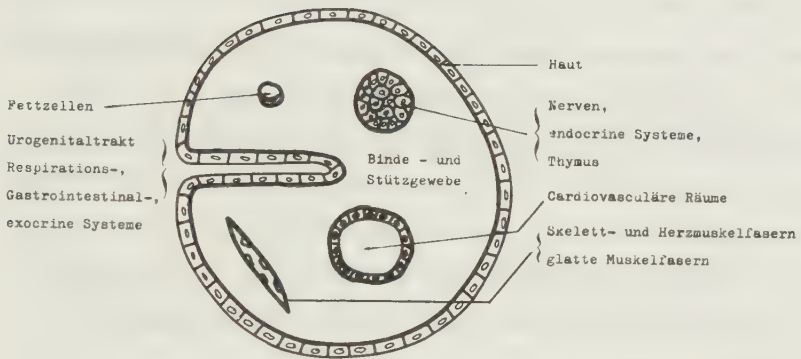


Abbildung 1: Darstellung des Vorkommens und der Aufgabe von Basalmembranen (nach R. Vracko, 18)

Abbildung 1 zeigt die anatomischen Beziehungen der Basalmembran zu verschiedenen Geweben und Zelltypen (18). Sie liegt zwischen parenchymalen Zellen und dem Bindegewebe bzw. Stützgewebe. Parenchymale Zellen schließen ein: die epithelialen Zellen der Epidermis und epidermalen Zellen des Harn-, Genital-, Respirations- und Gastrointestinaltraktes, sowie alle exokrinen Drüsen, endothelialen Zellen des cardiovaskulären Systems, die mesothelialen Zellen von Körperhöhlräumen und Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, endokrinen Zellen, Muskelfasern und Fettzellen.

Funktion der Basalmembran (17)

Die Basalmembranen stellen den Abschluß des endothelialen bzw. epithelialen Gewebes gegenüber Bindegewebe dar und vermitteln gleichzeitig eine enge Verbindung der verschiedenen Gewebe zueinander. Die Basalmembranen bilden bei der Embryonalentwicklung eine wichtige Unterlage für die sich differenzierenden Zellen und spielen somit eine wesentliche Rolle beim strukturellen Aufbau von Organen und Geweben.

Eine wichtige Aufgabe der Basalmembran ist ihre Filtrationsfunktion. Sie stellen in Blutgefäßen und in den Glomeruli eine wichtige Filtrationsbarriere dar, die das Durchdringen von Makromolekülen entsprechend ihrer Größe und Ladung kontrollieren. Die Permeabilität ist sehr unterschiedlich und beträgt z.B. bei glomerulären Kapillaren $100 \text{ \AA}$, wogegen im Intestinaltrakt ein Durchdringen von Molekülen mit einem Durchmesser von $500 - 700 \text{ \AA}$ möglich ist.

Struktur und Aufbau der Basalmembranen

Als Hauptbestandteile treten kollagene Komponenten und Glykoproteine auf. Über die Zusammenhänge dieser Bestandteile und insbesondere über Art und Zahl sowie den molekularen Aufbau der Komponenten ist heute noch wenig bekannt.

Zwei Gründe, die ihre Untersuchung erschweren, sind dafür verantwortlich:

- 1) Sie sind unter physiologischen Bedingungen unlöslich und
- 2) im Gewebe nur in relativ geringen Mengen vorhanden z.B. Glomeruli, Linsenkapsel).

Man geht daher so vor, daß ihre Bestandteile durch denaturierende Agentien (Harnstoff + Reduktion) oder wirkungsvoller durch proteolytischen Abbau in Lösung gebracht werden (16,19). Durch limitierten Pepsinabbau konnte Kefalides (20) ein tripelhelikales Kollagenfragment als Hauptfraktion erhalten, das nach Denaturierung eine α Kette mit einem Molekulargewicht der α Ketten der interstitiellen Kollagene ergab. Er nahm daher einen ähnlichen molekularen Aufbau an, nannte es Typ IV Kollagen und postulierte eine molekulare Struktur von $\alpha 1(IV)$ ₃.

Gegen dieses einfache Bild sprachen Untersuchungen von Spiro (19), der ein Auflösen der Basalmembran mit Harnstoff unter reduzierenden Bedingungen versuchte. Auch Detergentien lösten die Membran und man erhielt ein sehr komplexes Gemisch von kollagenen und nichtkollagenen Proteinen. Mit der Polyacrylamidelektrophorese konnten neben

hochpolymeren Anteilen mehr als 10 Komponenten mit Molekulargewichten von 30 - 220 kD nachgewiesen werden.

Die Basalmembrankollagene zeigen trotz vieler Gemeinsamkeiten gegenüber interstitiellen Kollagenen charakteristische Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung.

Gemeinsam ist, daß $\frac{1}{3}$ aller Aminosäuren Glycin und $\frac{1}{5}$ Prolin und Hydroxyprolin sind. Auch der Gehalt an Histidin, Valin, Methionin und Tyrosin ist ähnlich. Charakteristisch für Basalmembrankollagen aber ist der hohe Hydroxylierungsgrad des Prolins. Der Hydroxylysin-gehalt ist mit 40 - 60 Resten pro 1000 bedeutend größer als im interstitiellen Kollagen, wo er nur 4 - 24 Reste pro 1000 beträgt. Die Summe von Lysin und Hydroxylysin ist nahezu doppelt so groß, und die meisten der Hydroxylysine sind mit Galactosyl- bzw. Glukosylgalactosyl-Resten verknüpft. Isoleucin- und Leucingehalt ist größer, der von Alanin dagegen deutlich geringer. Cystein, nur in Typ III Kollagen anzutreffen, wird im Basalmembrankollagen in unterschiedlichen Mengen aufgefunden.

In den letzten Jahren wurde in mehreren Laboratorien die Untersuchung von Basalmembranen intensiviert. Dabei stellte man fest, daß durch limitierten Abbau (vorwiegend mit Pepsin) abhängig von den Versuchsbedingungen, verschieden

große kollagene Fragmente auftraten. Diese Tatsache war für kollagenes Material ungewöhnlich, da interstitielles Kollagen in seiner tripelhelikalen Form pepsinbeständig ist. Somit zeigt das Basalmembrankollagen gegenüber den interstitiellen Kollagenen neben der deutlich verschiedenen Aminosäurezusammensetzung auch noch eine Pepsinlabilität.

Für die Untersuchungen von Basalmembranbestandteilen hat sich auch ein transplantierbarer, als EHS-Sarkom bezeichneter Tumor in lathyritischen Tieren (Mäusen) als günstig erwiesen (21). Der Maustumor produziert in großen Mengen extrazelluläre Basalmembranmatrix, wovon etwa 50% der Proteine durch schonende Extraktionsverfahren, also ohne proteolytischen Abbau, gelöst und untersucht werden konnten. Die nach Reduktion auftretenden Ketten zeigen ein Molekulargewicht zwischen 140 - 180 kD. Nach proteolytischer Behandlung der Tumormatrix treten ähnliche Peptidfragmente auf, wie sie auch aus authentischen Basalmembranen erhalten werden können.

Biosynthetische Studien mit Basalmembran synthetisierenden Zellen (Linsenkapsel, Endothelzellen, Epithelzellen) (22,23,24) ergaben Peptidketten mit Molekulargewichten von 160 kD und 180 kD, also ähnliche Ketten, wie sie auch beim Maustumor erhalten wurden. Durch Puls-chase Experimente konnten keine Hinweise erhalten werden, daß diese Ketten,

ähnlich wie beim interstitiellen Kollagen die Pro- α Ketten, in kleinere Polypeptide übergehen, bevor sie in der extrazellulären Matrix abgelagert werden.

Am Anfang meiner Doktorarbeit zeichnete sich somit folgendes Bild ab:

Das Basalmembrankollagen wird in einer Größe (160 - 180 kD) vergleichbar der Vorstufen der interstitiellen Kollagene Typ I, II und III synthetisiert. An beiden Enden können globuläre, nichthelikale Domänen sein, die vor dem Einbau in die Matrix nicht abgespalten werden. Diese Bereiche sind für die Disulfidquervernetzung verantwortlich. Die tripelhelikalen Bereiche erweisen sich im Gegensatz zu denen der interstitiellen Kollagene gegen proteolytische Enzyme labil. Als Hauptfraktion wird dabei ein Polypeptid mit der Größe der interstitiellen α Ketten gefunden (25).

Nichtkollagene Komponenten in Basalmembranen

Ein zweiter wichtiger Bestandteil der Basalmembranen sind strukturelle Glykoproteine (16). Sie enthalten kein Hydroxy-lysin und Hydroxyprolin. Aus Tumormatrix gelang es beträchtliche Mengen eines Glykoproteins, genannt Laminin, zu isolieren (26). Das Laminin besteht aus mindestens 2 Polypeptidketten (Molekulargewicht 220 und 400 kD), die durch Disulfidbindungen verbunden sind. Diese Komponente ist

immunologisch und chemisch von einem anderen Glykoprotein, dem Fibronektin, das ebenfalls in der Basalmembran anzu-treffen ist, verschieden. Weiterhin wurden sulfatierte Glykosaminoglykane (Heparansulfat) gefunden, die für die ladungsselektiven Filtriereigenschaften der Basalmembranen verantwortlich gemacht werden (27).

Bedeutung der Basalmembran in medizinischer Sicht

Die Basalmembranen, deren wichtigste Aufgabe die Stütz- und Filtrationsfunktion ist, werden bei vielen Erkrankungen der Niere und des Gefäßsystems in Mitleidenschaft gezogen. So wird z.B. bei gewissen Stadien von Diabetes melitus, Vasculitis oder Sklerodermie eine abnorme Synthese von Basalmembranen beobachtet, was zu Angiopathien oder zu sklerotischen Veränderungen Anlaß geben kann. Gründe für diese pathologischen Erscheinungen sind unbekannt. Ein Ziel der protein- und biochemischen Arbeiten über Struktur und Stoffwechsel der verschiedenen Komponenten der Basalmembran ist es, die Grundlage für ein besseres Verständnis dieser pathologischen Geschehen zu schaffen.

AB Kollagen (auch als Typ V Kollagen bezeichnet)

Abschließend soll noch das kürzlich isolierte AB Kollagen erwähnt werden. Durch proteolytischen Abbau von verschiedenen Geweben (Amnion- und Chorionmembran, Haut, Blutgefäße, Muskel, Knochen, Knorpel) werden α Ketten (mit α A

und αB bezeichnet) erhalten, die zu den Typen I - IV eine deutlich verschiedene Aminosäurezusammensetzung aufweisen (siehe Tabelle 2, Seite 41). Dieses Kollagen sollte zur Familie der interstitiellen Kollagene zugerechnet werden, und man nimmt an, daß es in einer Struktur $\alpha A(\alpha B)_2$ vorliegt (28,29,30); einige Autoren (31,32) postulieren auch αA_3 und αB_3 .

Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, daß das Typ V Kollagen weitverbreitet im Organismus vorkommt und assoziiert mit Basalmembranen sein kann (33).

Die folgende Tabelle 1 zeigt übersichtlich Vorkommen, Eigenschaften und Molekülstruktur der bekannten Kollagentypen.

Molekül	Chemische Eigenschaften Charakteristika	Faserform, Gewebeverteilung
Typ I $\alpha 1(I)_2$ 2	Ein Hybridmolekül, zusammengesetzt aus 2 $\alpha 1$ und einer basischeren, hydrophoben $\alpha 2$ Kette	Große, gutstrukturierte Fasern: Knochen, Dentin, Sehnen und praktisch in allen Bindegeweben
$\alpha 1(I)_3$	Ähnlich Typ I, ohne $\alpha 2$ Kettenanteil (34)	Faserform, unbekannte Gewebeverteilung, virusinduzierter Mäusetumor, in Kulturen von Teratocarcinomzellen, bestimmten Fibroblastlinien und Chondrocyten in geringer Menge (5-15%), wahrscheinlich überall
Typ II $\alpha 1(II)_3$	Hoher Gehalt von Hyl und glykosyliertem Hyl	Dünne Fasern oder Fibrillen: hyaliner Knorpel, einige Fibroknorpel, Chorda und Glaskörper
Typ III $\alpha 1(III)_3$	Relativ viel 4-Hyp und Gly und 2 Cysteinreste pro Kette	Feines retikulares Netzwerk, Dermis Uteruswand, Gefäßwände und in einer Reihe anderer weicher Bindegewebe
Typ IV unbekannt	Hoher Gehalt an Hyl und glykos. Hyl, Disulfidbrücken, möglicherweise größere globuläre Bereiche	Basalmembranen: Gefäße, Niere (Glomeruli, Tubuli), Auge (Linsenkapsel, Descemetische Membran), Gehirn (Plexus Chorioideus), Lunge (Alveoli), Embryo (Reichertsche Membran, Plazenta, Amnion Chorion)
Typ V $\alpha A(\alpha B)_2$ (oder $\alpha A_3 + \alpha B_3$)		Nachgewiesen in menschlicher Haut, Blutgefäßwänden, Muskel, Knochen, Knorpel, Plazenta

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Charakteristika der bekannten Kollagentypen
Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Typen siehe Tabelle 2, Seite 41.

2. AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel der Arbeit war es, Grundlagen für die Untersuchung der Aminosäuresequenz von Basalmembrankollagen zu schaffen. Voraussetzung dafür war, das Kollagen in größerer Menge zu isolieren.

Dazu war es notwendig, ein Organ mit großem Basalmembrangehalt zu wählen. Menschliche Plazenta erwies sich als besonders geeignetes Gewebe, das nicht nur leicht zugänglich, sondern auch gut zu bearbeiten war.

Durch Behandlung mit Pepsin sollte die Basalmembran in Lösung gebracht werden und das Basalmembrankollagen von den anderen Kollagenen durch fraktionierte Fällung getrennt werden.

Die Bedingungen des Pepsinabbaues sollten so gewählt werden, daß hauptsächlich Peptidketten mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kD auftraten. Diese Ketten und die in geringerer Menge anfallenden kleineren Fragmente sollten durch chromatographische Methoden getrennt, gereinigt und durch Diskelektrophorese, Aminosäurezusammensetzung, Bromcyanabbau und immunologische Methoden charakterisiert werden.

Mit dem Peptid von 100 kD waren Sequenzuntersuchungen geplant. Nach Spaltung mit Bromcyan sollten die entstandenen

Fragmente getrennt und deren N-terminale Sequenz bestimmt werden und somit ein erster Eindruck über die Primärstruktur des Basalmembrankollagens erhalten werden.

3. ERGEBNISSE

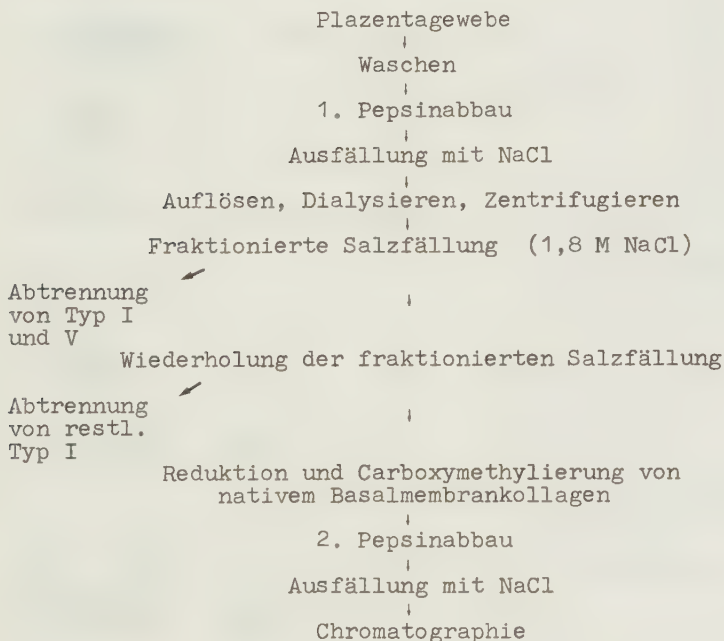
3.1 In Lösung bringen von nativem Basalmembrankollagen durch limitierten Pepsinabbau

Da proteinchemische Untersuchungen bis zur Sequenzierung durchgeführt werden sollten, mußten größere Mengen an Basalmembrankollagen rein isoliert werden. Es konnte dabei nicht von reinen Basalmembranen (Linsenkapsel) ausgegangen werden, da sie einerseits schwierig zu gewinnen und andererseits nur in geringen Mengen verfügbar sind. Es wurde daher menschliche Plazenta gewählt, da das Gewebe einen hohen Basalmembrangehalt aufweist und auch leicht beschafft werden konnte.

Aufgrund der zu erwartenden Labilität der kollagenen Pro-

teine gegenüber proteolytischen Enzymen, sollte eine möglichst schonende Isolierungsmethode erarbeitet werden. So wurde versucht, unter milden Bedingungen die Basalmembran mit Pepsin möglichst vollständig in Lösung zu bringen, ohne das z.T. pepsinlabile Kollagen zu stark zu zerstören.

Der schließlich erarbeitete Aufarbeitungsgang ist im folgenden Schema übersichtlich dargestellt:



Ein typisches Beispiel einer solchen Aufarbeitung ist in Abbildung 2 gezeigt, wo die einzelnen Präparationsstufen mit Hilfe der Diskelektrophorese verfolgt wurden.

Das Plazentagewebe wurde bei 20°C und mit einem Enzym/Substratverhältnis von 1/10.000 in Lösung gebracht. Das nach dem 1. Pepsinabbau gelöste Material enthält, unter denaturierenden Bedingungen (Abbildung 2b), neben dem Basalmembrankollagen, das hochmolekular nicht ins Gel eindringen kann, die Ketten des Typ I und Typ V Kollagens. Die beiden Kollagentypen wurden durch fraktionierte Fällung mit 1,8 M Natriumchlorid entfernt, wobei Typ I und V im Überstand verblieben, während Basalmembrankollagen präzipitiert wurde. Die elektrophoretische Untersuchung (Abbildung 2d) zeigte, daß zur vollständigen Abtrennung die Prozedur einmal wiederholt werden mußte.

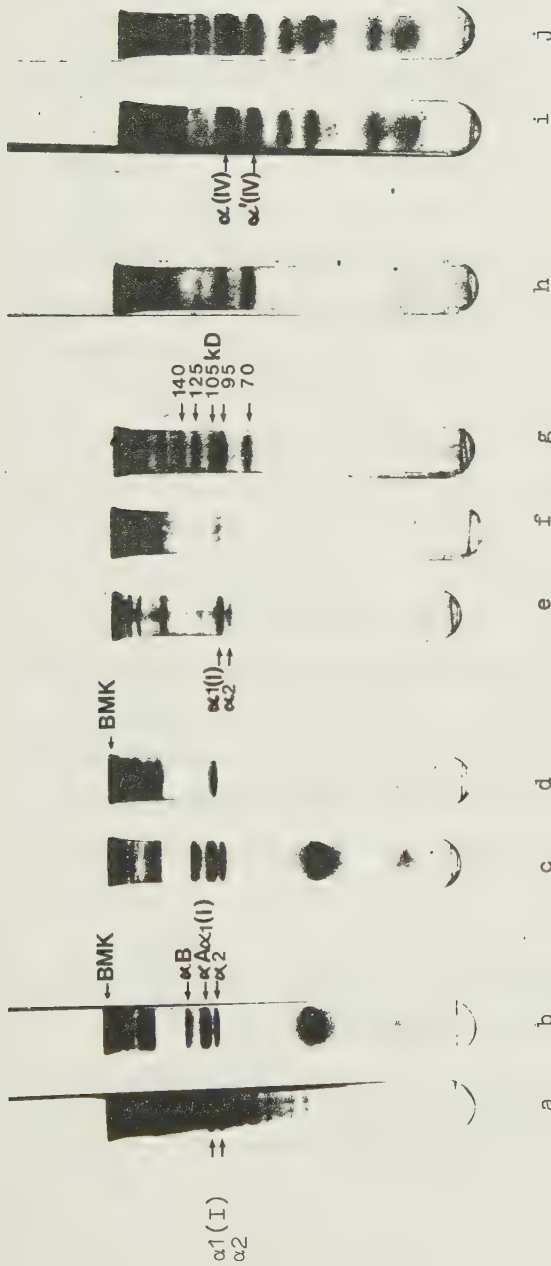


Abbildung 2: SDS-Polyacrylamidgele, 5%; (Exp. T. 8.4.1)

- a) Typ I Kollagen, Standard
 - b) Gelöstes Material nach dem 1. Pepsinabbau
 - c) Lösliche Komponenten } 1,8 M NaCl-Fällung
 - d) Niederschlag
 - e) Lösliche Komponenten } Wiederholung, 1,8 M NaCl-Fällung
 - f) Niederschlag
 - g) Probe f, Diskelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen
 - h) Probe f nach Reduktion und Carboxymethylierung
 - i) Probe nach 2. Pepsinabbau
 - j) Probe i, Diskelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen
- BMK Basalmembrankollagen
AB Kollagen (Typ V Kollagen)

Wird nun die Diskelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abbildung 2g), treten eine Anzahl von Ketten mit Molekulargewichten von 70 - 140 kD und höher auf.

Aus dieser Erkenntnis, daß Disulfidbrücken einer der Gründe für das hohe Molekulargewicht des Basalmembrankollagens sind, wurde eine Reduktion und Carboxymethylierung der Sulfhydrylgruppen unter nativen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 2h). Dadurch sollten vor allem nichtkollagene, durch Disulfid verfestigte Strukturen, aufgelockert und einem 2. Pepsinabbau zugänglich gemacht werden.

Das Basalmembrankollagen nach dem 2. Pepsinabbau wird in Abbildung 2i gezeigt. Ein Vergleich dieses Materials mit dem, untersucht unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 2j) zeigt, daß auch ohne Reduktion ein erheblicher Anteil als Ketten mit einem Molekulargewicht von 90 kD und kleineren Peptiden auftreten, und daß die hochmolekularen Anteile unter denaturierenden Bedingungen weitgehend reduziert werden können.

Die beiden Hauptkomponenten mit 90 und 70 kD werden im folgenden mit α (IV) und α' (IV) bezeichnet (*).

(*) Da für Basalmembrankollagen keine einheitliche Nomenklatur existierte, wurde für die 90 kD-Kette α (IV) und für die 70 kD-Kette α' (IV) eingeführt.

Auffallend war, daß bei geringer Variation der Pepsinspal-
tungen, insbesondere bei Veränderung der Pepsinmenge des
2. Abbaus, unterschiedliche Mengen an Komponenten resul-
tierten. So erhöht sich der Anteil der Fragmente mit Mole-
kulargewichten unter 70 kD bei intensiverer Proteolyse.

3.1.1 Kinetische Untersuchung des 2. Pepsinabbaus

Diesen Untersuchungen lagen folgende zwei Fragestellungen
zugrunde:

- 1) Wie kann der 2. Pepsinabbau optimal nach Zeit und Kon-
zentration an Enzym gestaltet werden, um α (IV und α' (IV)
in großer Menge zu isolieren?
- 2) Warum tritt die Komponente α' (IV) bei verschiedenen Auf-
arbeitungen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen auf?

Ein typisches Experiment, in welchem die Zeit des Pepsin-
abbaus variiert wurde, ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Dem Reaktionsgemisch wurden zu bestimmten Zeiten Aliquote
entnommen und die enzymatischen Reaktionen durch Neutrali-
sieren abgestoppt. Der Fortgang des Abbaus wurde durch Disk-
elektrophorese unter nichtreduzierenden und reduzierenden
Bedingungen verfolgt.

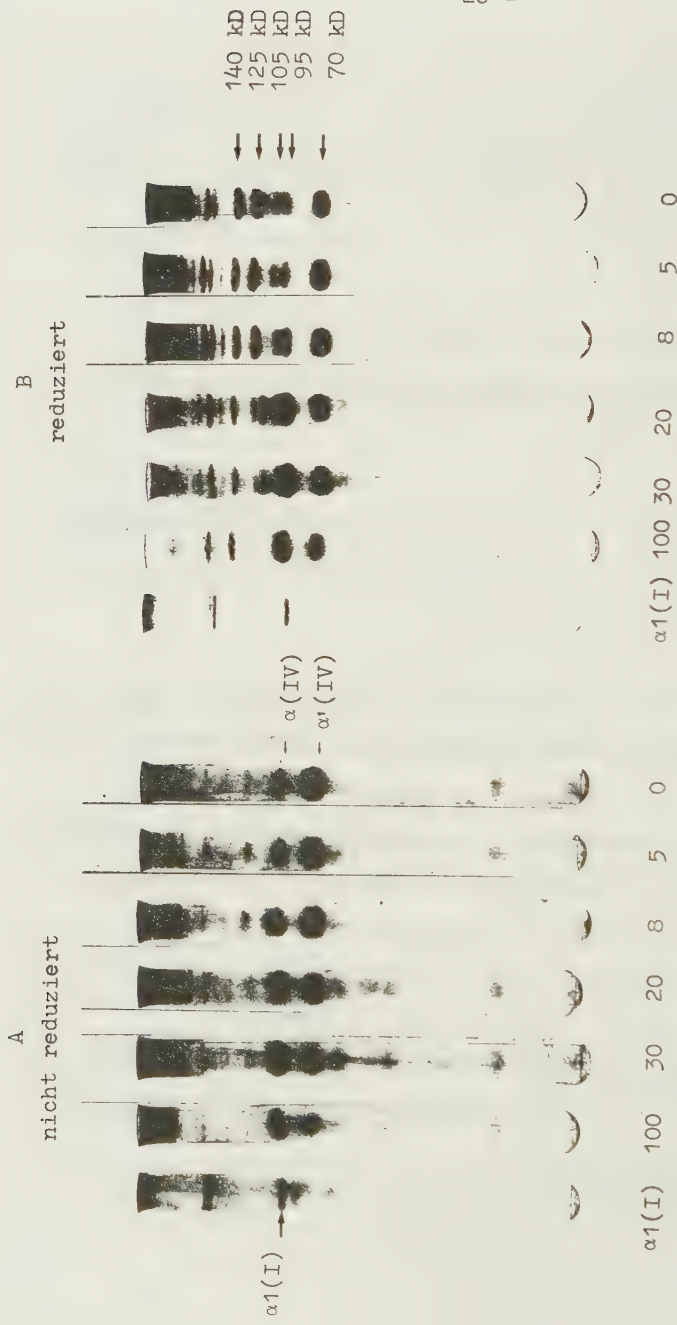


Abbildung 3: SDS-Polyacrylamidgele, 5%; (Exp. T. 8.4.1)

Kinetische Verfolgung des 2. Pepsinabbaus.

Bedingungen: 0,5 M HCOOH, 20°C, 1 mg Pepsin/100 mg Kollagen

Betrachtet man zunächst Abbildung 3A, dann stellt man fest, daß die Komponenten $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha'(\text{IV})$ bereits zum Zeitpunkt 0 vorliegen. Die Konzentration an $\alpha'(\text{IV})$ ist von Anfang an größer, erreicht ein Maximum bei 8 Stunden und nimmt anschließend wieder ab. Die $\alpha(\text{IV})$ Komponente ist anfangs schwach, später treten zwei Banden auf, die nach 20 Stunden intensiver werden und am Ende des Versuchs zu einer Bande verschmelzen. Bemerkenswert ist noch, daß die hochpolymeren Aggregate gegen Ende des Versuchs weiter in das Gel eindringen können. Die $\alpha(\text{IV})$ Kette wird ganz offensichtlich aus dem hochpolymeren Material herausgespalten, wogegen $\alpha'(\text{IV})$ in großer Menge bereits zu Beginn vorliegt und pepsinlabiler zu sein scheint und bei längeren Abbauezeiten schneller in kleinere Bruchstücke übergeht.

Nach Reduktion (Abbildung 3B) treten eine Reihe von zusätzlichen Banden auf. Auffallend sind zwei Komponenten mit Molekulargewichten von 140 kD und 125 kD, deren Konzentrationen bis zu 8 Stunden zunehmen, um dann mit dem Anstieg der $\alpha(\text{IV})$ Kette wieder abzunehmen. Es kann daher vermutet werden, daß sie in die $\alpha(\text{IV})$ Ketten und kleinere Fragmente übergehen.

Die hohe Empfindlichkeit von $\alpha'(\text{IV})$ im Vergleich zu $\alpha(\text{IV})$ gegen Pepsin wies hier außerdem erstmals auf die Möglichkeit des Vorliegens von genetisch verschiedenen Kettenmolekülen hin.

Als Folgerung kann aus diesem Versuch festgehalten werden, daß man, um eine gute Ausbeute an α -Ketten zu erhalten, eine 20-stündige Inkubation mit Pepsin anstreben muß.

3.2 Untersuchung und Charakterisierung des nativen Basalmembrankollagens

Bevor das durch den 2. Pepsinabbau erhaltene Basalmembrankollagen weiter charakterisiert werden konnte, mußte ein kleiner Anteil von sauren nichtkollagenen Substanzen sowie Typ III Kollagen, das während der fraktionierten Fällung bei der gleichen Salzkonzentration ausfällt wie Basalmembrankollagen, entfernt werden. Die Abtrennung der sauren Komponenten geschah durch Chromatographie an DEAE-Cellulose. Unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 4 A) wurden die kollagenen Anteile nicht auf der Säule zurückgehalten. Zur Trennung von Basalmembrankollagen und Typ III Kollagen wurde eine Chromatographie an CM-Cellulose angeschlossen. Die Fraktion, in der Basalmembrankollagen eluiert, zeigt manchmal einen und manchmal zwei Peaks, was ein Zeichen für die Uneinheitlichkeit des aus Basalmembranen isolierten Kollagens ist.

Durch immunologische Untersuchungen (Kapitel 4) konnte gezeigt werden, daß das so isolierte Basalmembrankollagen kein interstitielles Kollagen mehr enthielt.

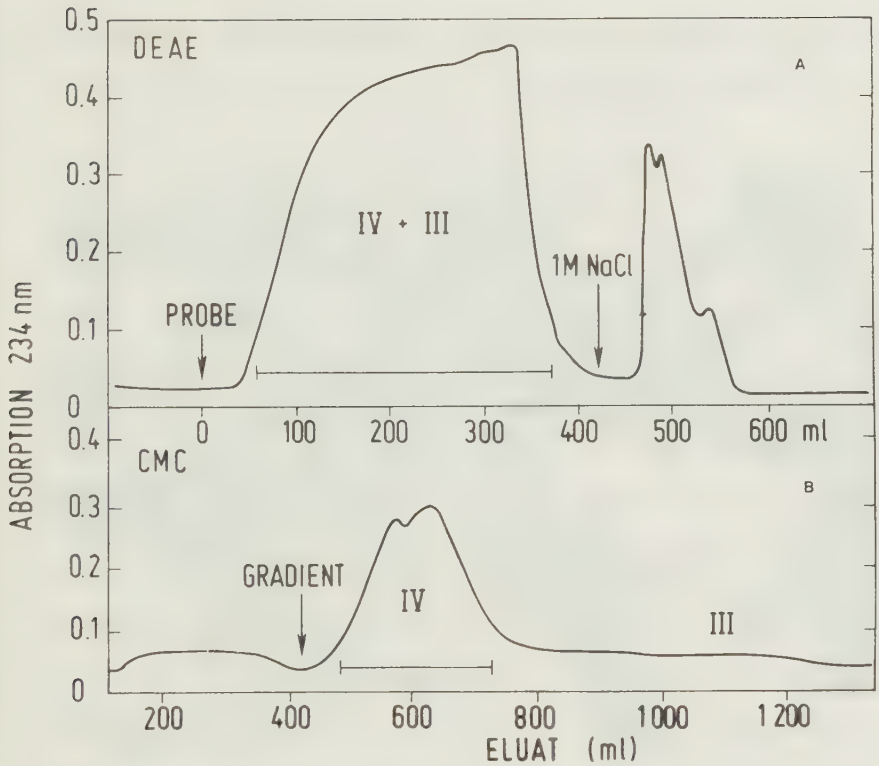


Abbildung 4: Chromatographische Reinigung des nativen Typ IV Kollagens.

Oben: Chromatogramm zeigt die Abtrennung von sauren Verunreinigungen durch DEAE-Cellulose

Unten: Chromatogramm zeigt die Abtrennung von Typ IV Kollagen von Typ III Kollagen durch CM-Cellulose (Exp. T. 8.3.1)

3.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung von long-spacing-segment Kristalliten (SLS)

Zunächst wurde versucht, das gereinigte, im tripelhelikalen Zustand vorliegende Basalmembrankollagen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zu charakterisieren. Beim interstitiellen Kollagen hat sich dafür besonders die Herstellung von SLS bewährt. Die SLS-Kristallite entstehen durch Zugabe von ATP zu sauren Kollagenlösungen, wobei sich die Kollagenmoleküle mit Hilfe der negativ geladenen ATP-Moleküle mit den Enden abschneidend parallel zusammenlagern. Durch Behandlung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat gelingt es, die polaren, geladenen Aminosäuren sichtbar zu machen, was sich in charakteristischen Querstreifungsmustern äußert. Man ist so in der Lage, ohne Kenntnis der Aminosäuresequenz Aussagen über die Verteilung der polaren und apolaren Aminosäuren zu machen. Diese Tatsache wurde für die Strukturaufklärung der interstitiellen Kollagentypen und für spezifische Enzymspaltungsversuche herangezogen (35,36,37).

Bei Übertragung dieser Methode auf pepsingelöstes Basalmembrankollagen stellte sich bald heraus, daß sie zur Untersuchung dieses Kollagens nicht besonders geeignet ist. So bilden die hochmolekularen Fraktionen unstrukturierte Niederschläge und nur ein geringer Teil, wahrscheinlich

die aus $\alpha(\text{IV})$ oder $\alpha'(\text{IV})$ Ketten bestehenden tripelhelikalen Fragmente können als Segmentkristallite beobachtet werden.

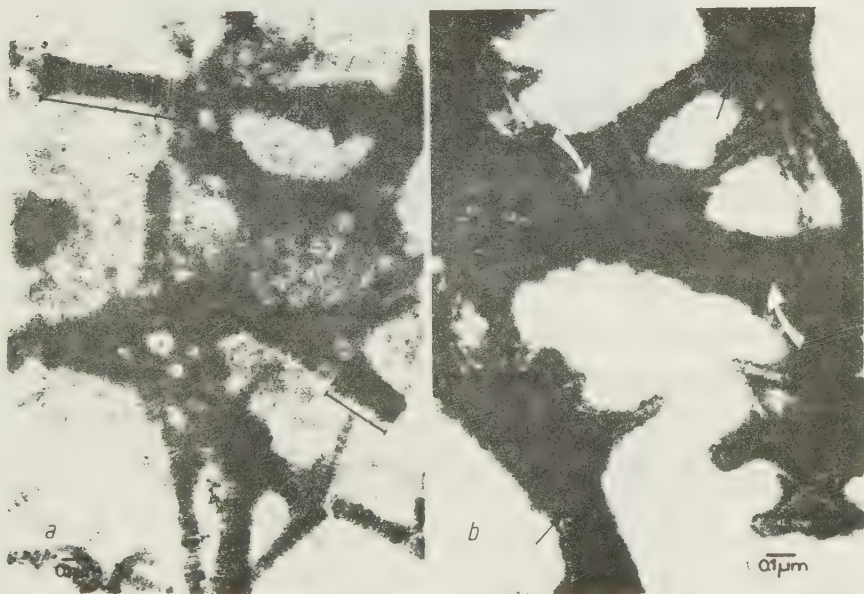


Abbildung 5: Die Bilder zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von SLS-Kristalliten;
a) Positivfärbung; b) Negativfärbung (Exp. T. 8.5)
Schwarze Pfeile: Unstrukturiertes Material;
Weiße Pfeile : Diffuse Endbereiche.

In Abbildung 5 erkennt man zwei verschieden lange Segmente mit Längen von 2900 und 2600 Å, die $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha'(\text{IV})$ bein-

halten könnten. Die Balken im Bild a geben die Länge eines Kollagenmoleküls wieder. Im Bild b kann man mittels der Negativfärbung deutlich die diffusen Enden der Segmente erkennen, möglicherweise eine Folge, daß sich unterschiedlich lange Moleküle aneinanderlagerten (weiße Pfeile). Unterschiede im Querstreifungsmuster sind nicht zu erkennen, so daß es keine Anzeichen für genetisch verschiedene Typen von Basalmembrankollagen gibt, die sich entscheidend in der Sequenz der polaren Aminosäuren unterscheiden.

Ein Vergleich der Querstreifungsmuster der Segmente aus Basalmembrankollagen mit denen des Typ III Kollagens (Abbildung 6) zeigt deutliche Unterschiede in der Verteilung der polaren geladenen Aminosäurereste.

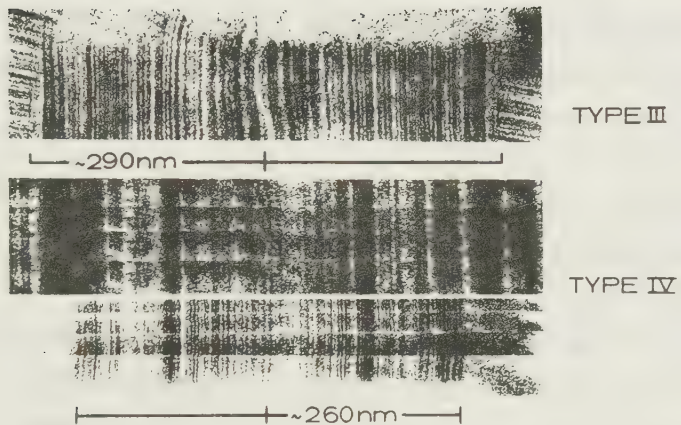


Abbildung 6: Vergleich der Querstreifungsmuster von Typ III Kollagen und den beiden verschieden langen Typ IV Kristalliten, als Dimere mit Symmetrieachse in der Mitte. Typ III und Typ IV Kollagen unterscheidet sich sehr deutlich durch die Verteilung ihrer polaren Aminosäuren.

3.3 Untersuchung und Charakterisierung der Peptidketten nach Denaturierung des Basalmembrankollagens

Alle Versuche, hochmolekulare Basalmembrankollagenanteile von niedermolekularen Fraktionen oder aus verschiedenen Ketten aufgebaute Fragmente im nativen Zustand zu trennen,

sind gescheitert. Weder fraktionierte Salzfällungen unter verschiedenen Bedingungen noch chromatographische Methoden waren erfolgreich. Eine weitere Auftrennung erschien daher nur nach Denaturierung erfolgversprechend.

Eine erste Fraktionierung des denaturierten Materials gelang durch Fällung mit 3 M Natriumchlorid, wobei die höhermolekularen Anteile gefällt wurden, während die α Ketten und die kleineren Fragmente in Lösung verblieben (Abbildung 7). Die beiden Fraktionen, die etwa in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 vorkamen, wurden fortan getrennt bearbeitet.

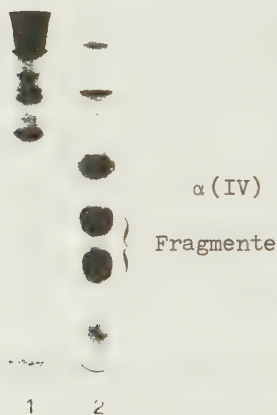
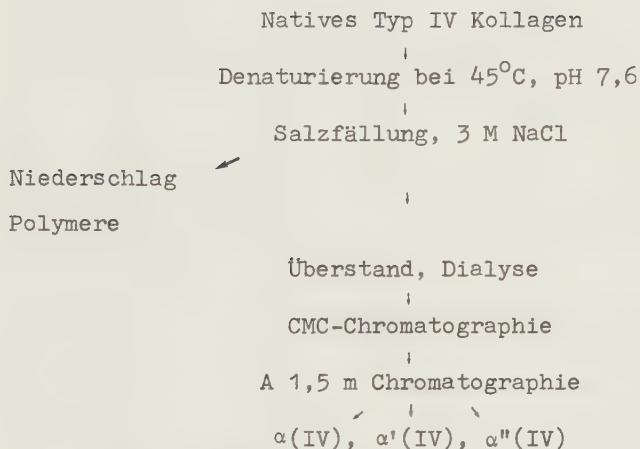


Abbildung 7: Die Polyacrylamid-gele (5%) zeigen die 3 M NaCl-Fällung;
1: Niederschlag
2: Lösli. Komponenten

Anmerkung: In dieser Präparation war kein $\alpha'(IV)$ vorhanden, siehe Text 3.2 bzw. 3.3.1

Das folgende Schema verdeutlicht die weitere Vorgangsweise bei der Trennung der $\alpha(IV)$ Ketten.



Die niedermolekulare Fraktion bestand vorwiegend aus α Ketten im Molekulargewichtsbereich von 90 und 70 kD. Sie wurden zunächst an CM-Cellulose getrennt, wobei 3 Fraktionen erhalten wurden (Abbildung 8), die zur Abtrennung von niedermolekularen Anteilen an Agarose 1,5 m rechromatographiert (Abbildung 9) werden mußten.

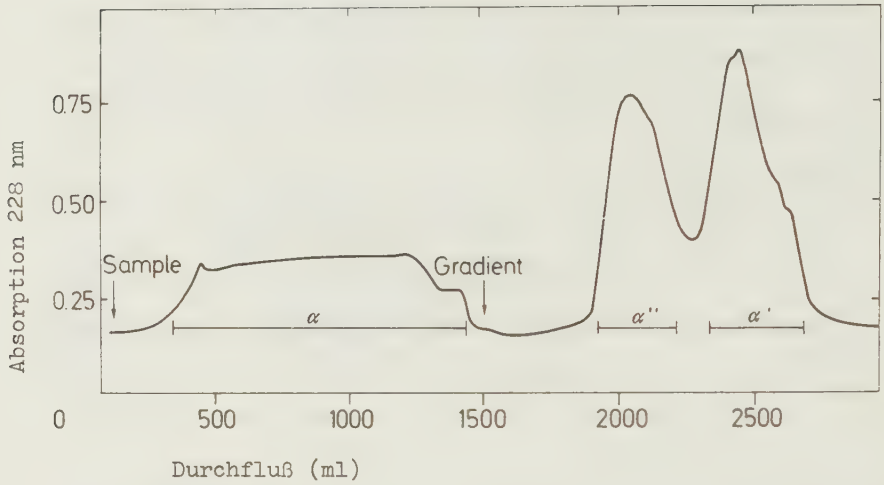


Abbildung 8: Das Chromatogramm zeigt die Trennung von
Basalmembrankollagen α Ketten an CM-Cellulose
(Exp. T. 8.3.1)
Erklärung von α'' (IV) siehe Text 3.3.3

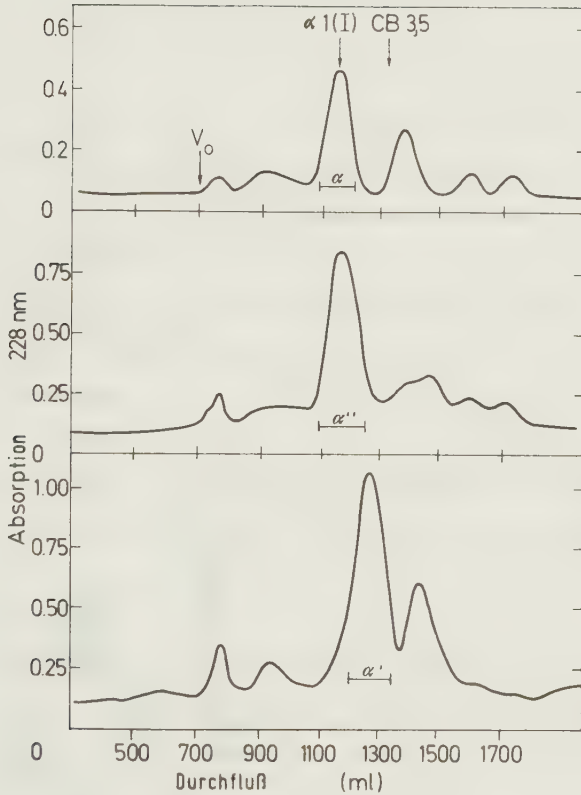


Abbildung 9: Die Chromatogramme zeigen die Trennung der 3 Fraktionen des CM-Celluloselaufes an Agarose 1,5m (Exp. T. 8.3.2a). Die Pfeile markieren die Elutionspositionen von $\alpha 1(I)$ und CB3,5 mit Molekulargewichten von 95 und 57 kD. V_o Ausschlußvolumen.

Agarosechromatographie sowie Elektrophorese zeigen neben $\alpha(\text{IV})$ eine zweite Kette mit sehr ähnlichen, nur geringfügig höherem Molekulargewicht, so daß sie bei normaler Diskelektrophorese schlecht oder gar nicht von $\alpha(\text{IV})$ getrennt wurde. Diese Kette wurde mit $\alpha''(\text{IV})$ bezeichnet. Aminosäureanalyse (Tabelle 2) und vor allem das Peptidmuster nach dem Bromcyanabbau (Abbildung 11) zeigt große Ähnlichkeit zwischen $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha''(\text{IV})$ an. Unterstrichen werden diese Befunde durch die Sequenzanalyse (Abbildung 12), die eine identische N-terminale Aminosäuresequenz anzeigen. Die Unterschiede im Molekulargewicht beider Ketten sind wahrscheinlich auf eine verschiedene Länge am C-terminalen Ende zurückzuführen. Weniger wahrscheinlich ist ein unterschiedlicher Gehalt an Kohlenhydratgruppierungen am Hydroxylysin.

$\alpha(\text{IV})$ und $\alpha''(\text{IV})$ sind nach Aminosäurezusammensetzung (Tabelle 2), BrCN-Peptidmuster (Abbildung 11) und nach der N-terminalen Sequenz charakteristisch verschieden von $\alpha'(\text{IV})$, dem 70 kD-Fragment. So weist $\alpha'(\text{IV})$ einen deutlich höheren Anteil an unpolaren Aminosäuren auf; Hydroxyprolin/Prolin und Hydroxylysin/Lysin sind in geringerer Konzentration vorhanden. Der Arginingehalt in $\alpha'(\text{IV})$ ist mit 4,5 Mol% mehr als doppelt so hoch wie in $\alpha(\text{IV})$.

Diese Daten zeigen klar, daß $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha'(\text{IV})$ aus zwei

Abbildung 10: Polyacrylamidplatten-
gel, 10% (Exp. T. 8.4.2)
 α Kettentrennung

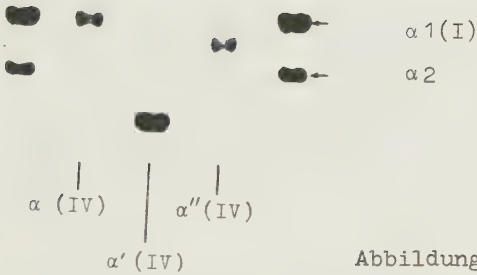
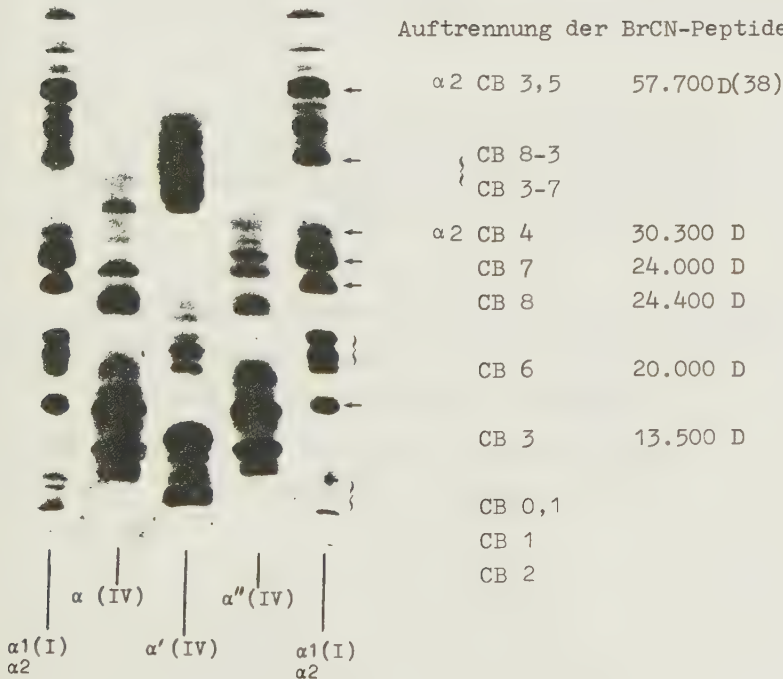


Abbildung 11: Polyacrylamidplatten-
gel, 15-25% (Exp.T.8.4.2)

Auftrennung der BrCN-Peptide



genetisch verschiedenen Ketten kommen. Diese Befunde werden bestätigt durch immunologische Untersuchungen in Kapitel 4.

Die Frage, ob beide Ketten aus einem tripelhelikalen Molekül kommen, kann nach der Beobachtung des zeitlichen Verlaufs des 2. Pepsinabbaus verneint werden, da $\alpha'(IV)$ und $\alpha(IV)$ nicht parallel entstehen und gleichzeitig wieder abnehmen.

Dies war der erste Hinweis, daß Basalmembrankollagen zwei genetisch verschiedene Kollagentypen enthält.

$\alpha(IV)$	Tyr-Phe-Asp-Leu-Gly-Leu- Y -Gly-Asp- Y -Gly-
$\alpha''(IV)$	Tyr-Phe-Asp-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly-Asp- Y -Gly-
$\alpha'(IV)$	Glu-Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu- Ile Ile

Abbildung 12: N-terminale Aminosäuresequenzen von $\alpha(IV)$, $\alpha''(IV)$ und $\alpha'(IV)$. Bestimmt nach der automatischen Sequenzanalyse mit dem "Protein-Peptid-Sequencer" der Fa. Beckman (Exp. T. 8.7)
Y nicht identifizierte Aminosäuren

	α (IV)	α'' (IV)	α' (IV)	$\alpha 1$ (I)	$\alpha 2$	$\alpha 1$ (II)	$\alpha 1$ (III)	αA (V)	αB (V)
Hyp	146	139	127	102	87	99	127	107	108
Asp	48	48	52	43	46	41	43	55	51
Thr	18	17	28	17	19	20	13	27	22
Ser	34	38	26	39	36	26	39	34	26
Glu	77	76	62	74	69	88	72	90	99
Pro	79	83	69	139	123	119	109	92	119
Gly	318	322	313	352	350	326	354	318	320
Ala	31	32	49	121	113	98	97	59	46
Val	30	30	24	21	34	18	14	30	19
Cys	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Met	15	14	12	7	5	9	8	10	7
Ile	34	33	42	7	15	9	13	18	20
Leu	54	54	59	21	33	25	22	37	40
Tyr	5	5	6	2	4	1	3	-	1
Phe	24	24	37	13	12	13	8	12	12
Hyl	61	59	42	5	9	14	5	25	36
His	6	7	8	2	11	2	6	10	7
Lys	5	6	6	31	23	22	30	18	19
Arg	20	19	45	51	53	50	47	57	48

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung menschlicher Kollagen-

α Ketten; Aminosäuren/1000 Reste. (Exp. T. 8.9)

Typ IV α Ketten: die Zusammensetzungen sind

Mittelwerte aus 6 Analysen von 2 verschiedenen

Präparationen; Korrekturen für Verluste während

der Hydrolyse wurden nicht gemacht.

3.3.1 Chromatographische Auftrennung von kleineren Pepsinfragmenten und deren Charakterisierung

Zusätzlich zu den Hauptkomponenten 90 und 70 kD treten niedermolekulare Fragmente auf (Abbildung 2 i). Ihre Menge hängt von der Intensität der 2. Pepsinbehandlung ab. Je intensiver die Pepsinbehandlung, desto höher der Anteil der kleineren Fragmente und desto geringer die Menge an 90 und 70 kD Komponenten. In Abbildung 7 fehlt das 70 kD-Peptid überhaupt und kleinere Fragmente sind in großer Menge vorhanden. Es war daher zu vermuten, daß die kleineren Ketten durch weiteren Abbau der größeren entstanden sind. Um dies zu überprüfen, wurden sie durch Gelchromatographie getrennt und durch Molekulargewichtsbestimmung, Aminosäureanalysen, Bromcyanpeptidmuster und Sequenzierung des N-terminalen Bereichs näher charakterisiert.

Die Trennung eines Fragmentgemisches, das nach Entfernung der hochmolekularen Anteile durch 3 M Natriumchlorid erhalten wurde, zeigt Abbildung 13. Die vier Hauptfraktionen A, B, C und D wurden für eine Charakterisierung durch Rechromatographie auf Agarose 1,5 m nachgereinigt.

Abbildung 14 zeigt die Diskelektrophorese der vier Fraktionen. Die Molekulargewichte, die durch Gelchromatographie und Disk-elektrophorese bestimmt wurden, sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 4 gezeigt.

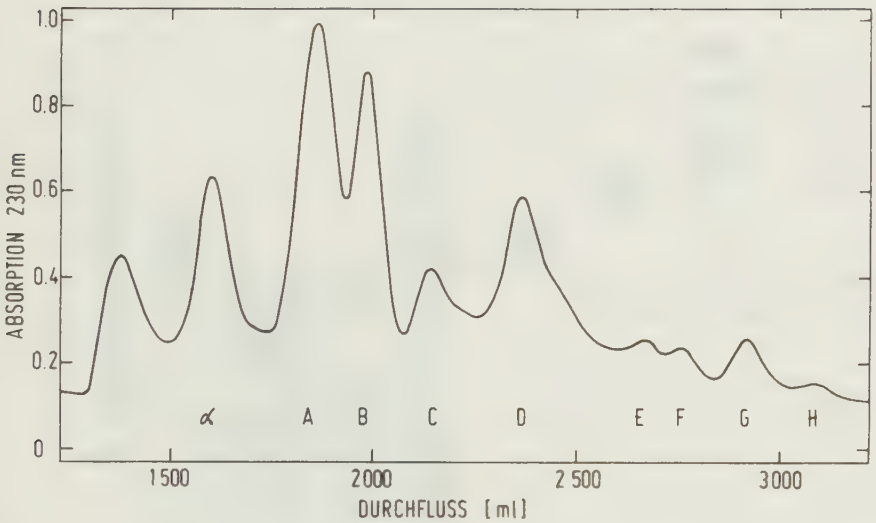


Abbildung 13: Chromatographie der Pepsinfragmente, erhalten nach intensiverer Behandlung (Enzym/Substrat = 1/5000, 40 Stunden, 20°C), auf Agarose 1,5m.

	α (IV)	α' (IV)	A	B	C	D	
Chromatographie	95	70	45	36	27	-	kD
Elektrophorese	95	70	47	39	28	19	kD

Tabelle 3: Molekulargewichtsbestimmung der Pepsinfragmente A, B, C und D

Standards: Elektrophorese α 1(I), CB3,5, CB3-7, CB8(38)

Gelchromatographie α 1(I), CB5, CB9B;
(Exp. T. 8.6)

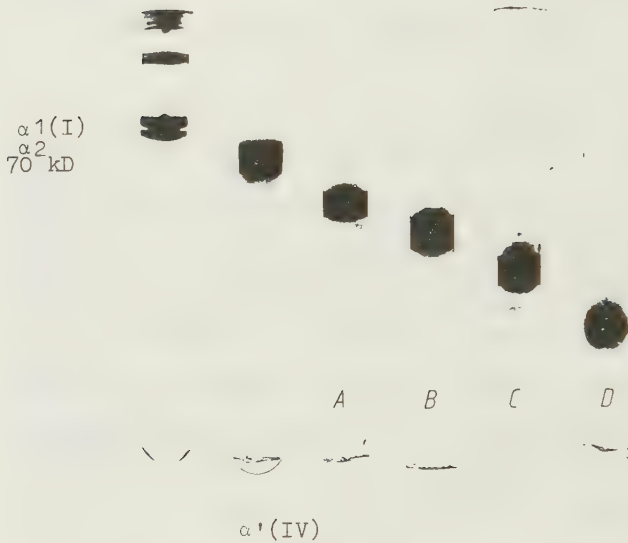


Abbildung 14: Molekulargewichtsbestimmung und Reinheits-
prüfung der isolierten Pepsinfragmente A, B, C
und D in SDS-Polyacrylamidgelen (7,5%)
(Exp. T. 8.4.1)

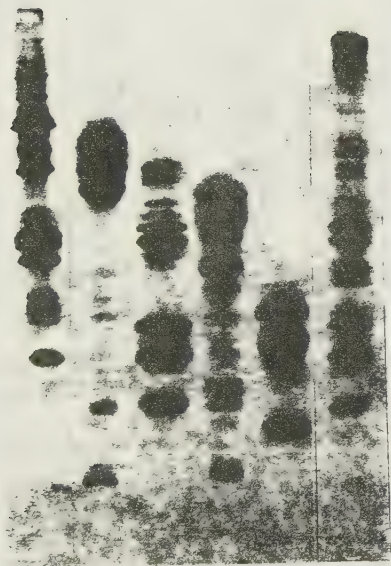


Abbildung 15: Polyacrylamidplattengel, 15-25% ;
(Exp. T. 8.4.2)

Auftrennung der BrCN-Peptide von
A, B, C, D bzw. α (IV) und $\alpha 1(I)\alpha 2$

Typ I A B C D α (IV)

	α' (IV)	α (IV)	A	B	C	D
Hyp	12,7	13,9	11,3	12,5	12,4	13,1
Asp	5,2	4,8	5,0	5,0	5,5	8,0
Thr	2,8	1,7	3,4	3,2	2,1	3,5
Ser	2,6	3,8	2,7	2,7	3,0	2,1
Glu	6,2	7,6	6,8	6,5	6,5	5,6
Pro	6,9	8,3	7,0	7,2	7,5	6,8
Gly	31,3	32,2	31,9	33,5	32,2	31,5
Ala	4,9	3,2	4,8	4,3	4,4	3,9
Val	2,4	3,0	3,2	3,1	2,3	2,3
Cys	-	-	-	-	-	-
Met	1,2	1,4	1,0	1,0	1,6	0,5
Ile	4,2	3,3	4,7	3,7	2,8	3,8
Leu	5,9	5,4	4,9	5,1	6,8	6,3
Tyr	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,6
Phe	3,7	2,4	3,5	3,3	3,5	2,9
His	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
Hyl	4,2	5,9	4,3	4,6	4,0	6,1
Lys	0,6	0,6	1,0	0,8	0,5	0,5
Arg	4,5	1,9	4,0	3,7	4,3	3,1

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung der Pepsinfragmente
(in Mol%)

Die Zusammensetzungen sind Mittelwerte aus 3 Analysen.
Korrekturen für Verluste während der Hydrolyse wurden
nicht gemacht.

Da im Basalmembrankollagen glykosyliertes Hydroxylysin vor-
kommt, wurde eine Bestimmung von Glucosyl-Galactosyl-Hydroxy-
lysin und Galactosylhydroxylysin vorgenommen. Dafür wurde
das Bestimmungsverfahren so adaptiert, daß mit dem Durrum
D 500 Aminosäureanalysator, unter Verwendung des normalen
Trennprogramms, eine Quantifizierung möglich wurde
(Exp. T. 8.10).

	Gesamt Lys	Gesamt Hyl ^a	Glu-Gal-Hyl ^b	Gal-Hyl ^c	freies Hyl ^d
α (IV)	0,5	6,1(92)	5,4(88)	0,5(9)	0,2(3)
α' (IV)	0,6	4,2(91)	3,6(86)	0,5(12)	0,1(2)
A	1,0	4,3(81)	3,6(84)	0,6(14)	0,1(2)
B	0,8	4,6(85)	3,9(84)	0,4(9)	0,1(2)
C	0,5	4,0(89)	3,4(85)	0,4(11)	0,2(4)
D	0,5	6,1(92)	4,5(74)	0,8(13)	0,8(13)

Tabelle 5: Hydroxylysingebundene Kohlenhydrate in

α (IV), α' (IV) und den Fragmenten A, B, C und D.

Werte in Mol%;

Zahlen in Klammern:

a) Hydroxylierungsgrad in %

b) Disaccharid gebunden an Hydroxylysin in %

c) Monosaccharid gebunden an Hydroxylysin in %

d) freies Hydroxylysin in %

α	Tyr-Phe-Asp-Leu-Gly-Leu- Y -Gly-Asp- Y -Gly-
α''	Tyr-Phe-Asp-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly-Asp- Y -Gly-
α'	Glu-Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Ile
A	Phe-Gly-Ile-Hyp-Gly-Leu- Y -Gly-Leu-Ala-Gly-Glu-Hyp-Gly-Phe- Y -Gly-
B	Leu-Gly-Leu- Y -Gly-Asp- Y -Gly-Asp-Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-
C	Gly-Arg-Leu-Gly-Leu-Hyp [*] -Gly-Gly- Y -Gly-Asp- Y -Gly-Met-Hyp [*] -Gly-Ala-Hyp [*] -Gly-Ile
D	Glu-Ala-Ile- . -Gly-Leu-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro-Hyp-Gly-Phe-Ala-Gly-Ile-

Abbildung 16: Aminoterminal Sequenzen von Typ IV Kollagen aus humaner Plazenta

Methode siehe Exp. T. 8.7

Y nicht identifizierte Aminosäure; Hyp^{*} bedeutet, daß auch Pro vorlag (Teilhdroxylierung); - . - nicht identifizierte Aminosäure im nicht-helikalen Bereich.

Wenn man die wichtigsten Ergebnisse zunächst betrachtet, so sieht man in Abbildung 15, daß das Peptid B ein der α (IV) Kette sehr ähnliches Bromcyanpeptidmuster aufweist. Durch die Sequenzanalyse in Abbildung 16 erhielt man die zusätzliche Information, daß B ein Teil von α (IV) ist. Das Fragment B hat gegenüber der α Kette am N-Terminus ein Tripeptid abgespalten, besitzt aber sonst die gleiche Aminosäuresequenz. Da B ein Molekulargewicht von 37 kD besitzt, muß durch mindestens eine Pepsinspaltung im Mittelbereich der Kette, der C-terminale Teil verloren gegangen sein.

Ein Vergleich der Bromcyanpeptidmuster von A in Abbildung 15 mit dem von α' (IV) in Abbildung 12 zeigt Ähnlichkeiten, die darauf hinweisen, daß α' (IV) und A aus der gleichen Kette stammen. Die kleineren Peptide C und D konnten nicht zugeordnet werden.

Lassen sich durch die Aminosäurezusammensetzungen zwar keine klaren Erkenntnisse über Zusammenhänge zwischen den Kettenbruchstücken gewinnen, so sieht man doch deutlich, daß es sich bei allen Peptiden um Fragmente aus der Basalmembran handelt. So ist die Kohlenhydratanalyse typisch für Basalmembrankollagen, und man findet, daß fast alle Hydroxylysine glykosyliert sind, und daß das Disaccharid überwiegt.

Das Fragment D zeigt etwas abweichende Werte und beginnt auch mit einer nichthelikalen Aminosäuresequenz. Sollte D aus einer der Ketten stammen, so müßte innerhalb ein nichthelikaler Bereich vorhanden sein.

Aus Abbildung 16 kann man ersehen, daß das Peptid C in Position 14 ein Methionin besitzt. Da BrCN spezifisch an Methioninbindungen spaltet, ergibt sich hier ein Überlappungsbereich. Diese Tatsache kann für die Zuordnung der Bromcyanpeptide bei der Primärstrukturaufklärung des Fragments C ausgenutzt werden.

Durch die automatische Sequenzanalyse und routinemäßige Identifizierung der PTH-Aminosäuren konnten die mit Y bezeichneten Aminosäuren nicht erkannt werden. Aus Untersuchungen von interstitiellem Kollagen weiß man aber, daß Hydroxylysin in Gly- X - Y ausschließlich die Y-Position besetzt. Da freies Hydroxylysin nur in geringen Mengen (vgl. Tabelle 5) vorkommt und üblicherweise gut identifiziert werden kann, könnten diese Positionen mit glykosyliertem Hydroxylysin besetzt sein, welches aufgrund der Kohlenhydratgruppe nicht auf normalem Weg identifiziert werden kann.

4. IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Das durch Pepsinabbau aus Plazenta gelöste und in α Ketten ähnliche Fragmente aufgetrennte Kollagen besitzt nach Aminosäurezusammensetzung und Kohlenhydratgehalt typische Charakteristika des Basalmembrankollagens. Es war aber notwendig, auch mit anderen Methoden zu zeigen, daß sie ein echter Bestandteil von Basalmembranen sind. Geeignet dazu erschienen immunologische Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus von der Mark, Dr. Juha Risteli und Dr. Rupert Timpl durchgeführt wurden.

4.1 Immunologische Vergleiche von nativem Typ IV Kollagen mit interstitiellem Kollagen

Zunächst war es notwendig, spezifische, reine Antikörper gegen Basalmembrankollagen zu erhalten. Man verwendete pepsingelöstes natives Basalmembrankollagen, das noch geringe Mengen an Verunreinigungen (z.B. nichtkollagene Proteine) enthielt. Hochgereinigte denaturierte Ketten erwiesen sich wegen zu geringer Immunogenität als ungeeignet zur Immunisierung. Wie aber aus Abbildung 17 zu entnehmen ist, reagieren Antikörper gegen natives Basalmembrankollagen auch mit denaturierten Ketten, so daß eine Reinigung der Antikörper durch Immunadsorption an gereinigten Ketten möglich war.

In Abbildung 17 ist gezeigt, daß die Reaktion der Antikörper gegen natives Basalmembrankollagen mit ^{125}J markiertem Antigen, durch kaltes natives, sowie denaturiertes Basalmembrankollagen vollständig inhibiert werden kann. Die interstitiellen Kollagene der Typen I, II und III zeigen dagegen keine Kreuzreaktion. Die αA und αB Ketten des Typ V Kollagens zeigen eine etwa tausendfach geringere Inhibitions-
wirkung, die wohl auf eine Verunreinigung mit Basalmembran-
kollagen zurückzuführen ist.

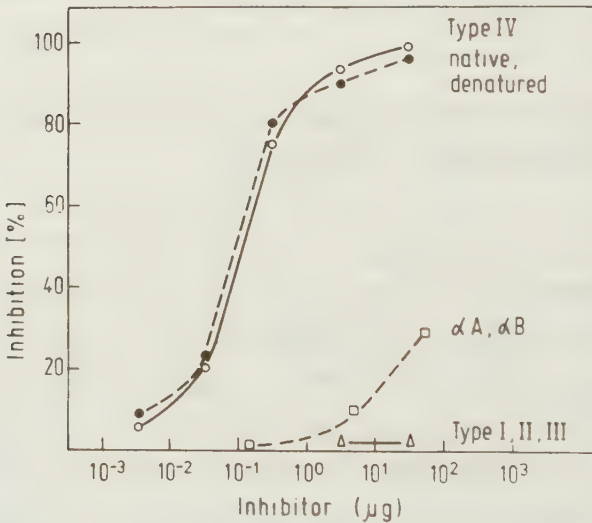


Abbildung 17: Radioimmuninhibitionstest mit Antikörpern gegen Typ IV Kollagen und ^{125}J -markiertes Typ IV Kollagen. Inhibitoren der Reaktion waren natives Typ IV Kollagen, denaturiertes Typ IV Kollagen, AB Kollagen sowie Typ I, II und III Kollagen

4.2 Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern gegen natives Basalmembrankollagen

Die durch Adsorption an gereinigten α Ketten des Basalmembrankollagens isolierten Antikörper wurden dazu verwendet, um mit der Immunfluoreszenzmethode festzustellen, ob die α (IV) und α' (IV) Kette wirklich aus Basalmembranen stammen.

Ein besonders gutes Testorgan ist das Auge, welches in der Descemet'schen Membran und in der Linsenkapsel gut beschriebene Basalmembranen besitzt, die von interstitiellem Bindegewebe umgeben sind. Wie in Abbildung 18 zu sehen, werden mit unseren Antikörpern nur die Basalmembranstrukturen angefärbt.

Auch in der Haut (Abbildung 19) und in der Plazenta (Abbildung 20) werden nur Basalmembranstrukturen angefärbt.

Damit wurde gezeigt, daß die isolierten kollagenen Moleküle Bestandteile der Basalmembran sind und in anderen Strukturen nicht vorkommen.

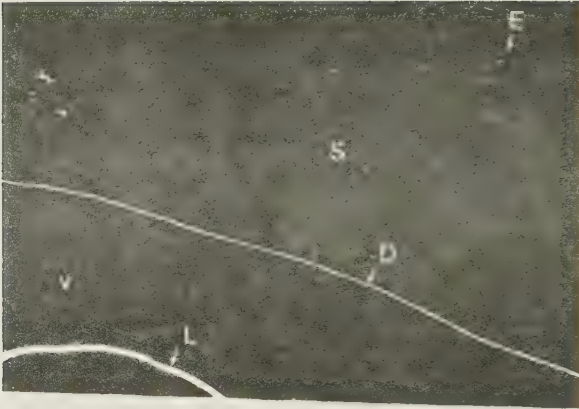


Abbildung 18: Immunfluoreszenzanfärbung eines fetalen
Kalbsauges mit Kaninchenantikörpern gegen
humanes Typ IV Kollagen (Gefrierschnitt).
(E Epithel, S Stroma, D Descemet'sche Membran,
L Linsenkapsel, v vordere Augenkammer).
Vergrößerung 180-fach

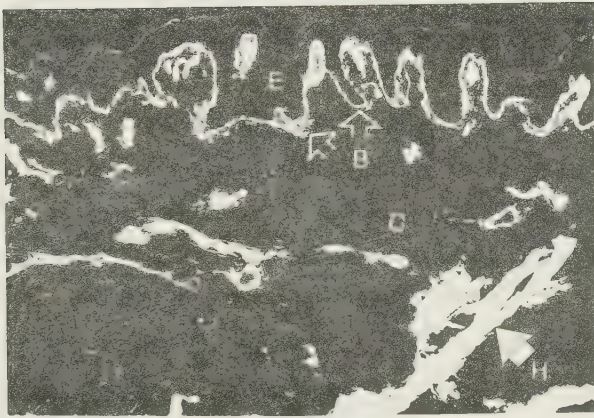


Abbildung 19: Immunfluoreszenzanfärbung von menschlicher Haut mit Kaninchenantikörpern gegen humanes Typ IV Kollagen (Gefrierschnitt).

(B Basalmembran, E Epidermis, C Corium, H Haarbälge) - Vergrößerung 180-fach

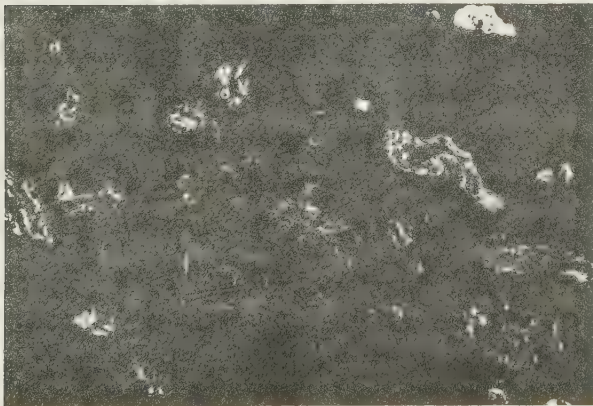


Abbildung 20: Immunfluoreszenzanfärbung von menschlicher Plazenta (Zotten) mit Kaninchenantikörpern gegen humanes Typ IV Kollagen (Gefrierschnitt).

4.3 Immunologische Untersuchungen von α (IV) und α' (IV) Ketten

Mit Hilfe der Immunologie konnte auch noch ein anderes Problem untersucht werden, und zwar ob α (IV) und α' (IV) genetisch miteinander verwandt sind oder ob sie aus zwei verschiedenen Kettentypen stammen.

Die beiden Ketten α (IV) und α' (IV) wurden mit ^{125}Jod markiert und die Bindung an Basalmembrankollagen-Antikörper mit den entsprechenden unmarkierten Ketten inhibiert.

Abbildung 21 zeigt das Verhalten der Kollagenfragmente im Radioimmuninhibitionstest.

Im Bild A ist das Inhibitionsverhalten von α (IV), α' (IV) und einem 140 kD-Fragment, dessen Isolierung in dieser Arbeit nicht beschrieben wurde, gezeigt. Der sehr ähnliche Kurvenverlauf von α (IV) und dem 140 kD-Fragment weist auf eine große Ähnlichkeit beider Ketten im Bereich der antigenen Strukturen hin. Um eine vergleichbare Inhibition auch mit α' (IV) zu erlangen, müßte man eine etwa hundertfach höhere Konzentration einsetzen. Dieser Befund wurde in einem zweiten Inhibitionsversuch überprüft (Bild B), in welchem die Bindung der markierten α' (IV) Kette mit den Antikörpern inhibiert wurde. Auch hier zeigte das Resultat nur geringste strukturelle Beziehungen zwischen den beiden

Membrankomponenten. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha'(\text{IV})$ aus verschiedenen Peptidketten stammen und eine genetische Verschiedenheit vorliegt.

Mit ähnlichen Versuchen, die hier nicht gezeigt werden, wurde auch die Verwandtschaft des Pepsinfragments B mit $\alpha(\text{IV})$ bekräftigt.

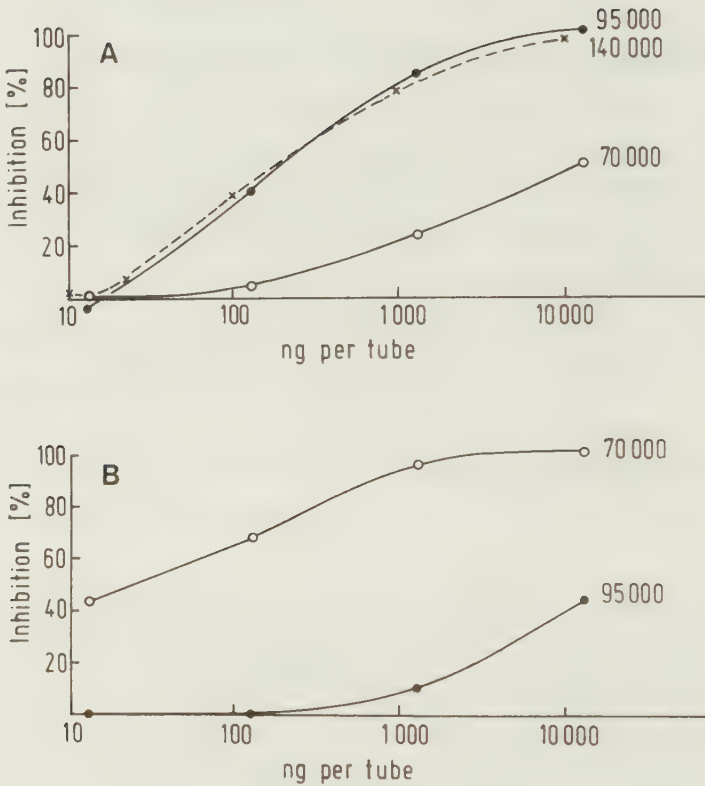


Abbildung 21: Radioimmuninhibitionstest von denaturierten Kollagenfragmenten aus menschlicher Plazenta mit Kaninchenantikörpern gegen natives Basalmembrankollagen (39,40).
In Bild A war $\alpha(IV)$ mit ^{125}Jod markiert;
in Bild B war $\alpha'(IV)$ mit ^{125}Jod markiert.

5. SEQUENZUNTERSUCHUNGEN DER α (IV) KETTE

Von Interesse ist, inwieweit sich die Aminosäuresequenz des Basalmembrankollagens, dessen struktureller Aufbau sichtlich verschieden ist, von der der interstitiellen Kollagene unterscheidet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in ersten Versuchen ein Einblick in die Sequenz des Basalmembrankollagens erarbeitet werden. Besonders geeignet für solche Untersuchungen erschien die α (IV) Kette, die stets als Hauptkomponente auftritt.

Nach Spaltung der α (IV) Kette mit Bromcyan wurden einige der Peptide isoliert und dem automatischen Edmanabbau unterworfen, wobei durchschnittlich eine N-terminale Sequenz von 30 - 40 Resten pro Peptid aufgeklärt werden konnte.

5.1 Spaltung mit Bromcyan

Die Fragmentierung mit Bromcyan ist in der Proteinchemie eine häufig angewandte Methode bei der Aufklärung der Primärstruktur, weil Bromcyan selektiv an der Carboxylseite des Methionins spaltet (41). Für die α (IV) Kette bedeutet dies, daß bei 15 Methioninresten (vgl. Tabelle 2)

16 Peptide zu erwarten waren.

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß unterschiedlich starker Untergrund und größere Mengen an höhermolekularen Peptiden erhalten wurden. Aufgrund der langen Dauer der Kettenisolierung war ein Teil der Methioninreste zu Methioninsulfoxid bzw. Methioninsulfon oxidiert und daher nur eine unvollständige Spaltung erzielt worden. Es wurde deshalb eine Reduktion mit 25%-iger Mercaptoäthanollösung (42) (Exp. T. 8.2) vorgenommen und dabei das in Abbildung 22 dargestellte Ergebnis erhalten.



Abbildung 22: Das Bild zeigt Bromcyan-peptidmuster von α (IV), in Bahn b nicht behandelt und in Bahn c mit 25% 2-Mercaptoäthanol reduziert vor der Spaltung. Die Bahnen a zeigen das Muster von $(\alpha^1)_2\alpha^2$ (I). Durchführung siehe 8.2.

Die Aminosäureanalyse des Bromcyanpeptidgemisches der α (IV) Kette zeigte, daß nach der Reduktion mit Mercapto-äthanol die Zahl der Homoserinreste von 12 auf 16 angestiegen war. Dies bedeutet, daß etwa 25% der Methionine während des Aufarbeitungsvorganges oxidiert wurden und so keine Spaltung durch BrCN möglich war.

5.2 Auftrennung der Bromcyanpeptide durch CMC-Chromatographie

Es wurde zunächst versucht, die Bromcyanpeptide der α (IV) Kette des Basalmembrankollagens durch CM-Cellulose-Chromatographie nach Bedingungen, wie sie für die Trennung der Bromcyanpeptide des interstitiellen Kollagens benutzt wurden, zu trennen (43). Die Abbildung 23 zeigt das Elutionsdiagramm einer solchen Chromatographie. Man erkennt eine große Anzahl von Fraktionen, die nur schlecht voneinander getrennt sind. Dieser Eindruck wird durch Plattengelelektrophorese der Fraktionen 3 bis 9 bestätigt, so daß die CMC-Chromatographie zur ersten Trennung dieses Bromcyangemisches nicht geeignet erscheint. Trotzdem wurden einige geeignet erscheinende Fraktionen vereinigt und durch Molekularsieb-Chromatographie weiter getrennt.

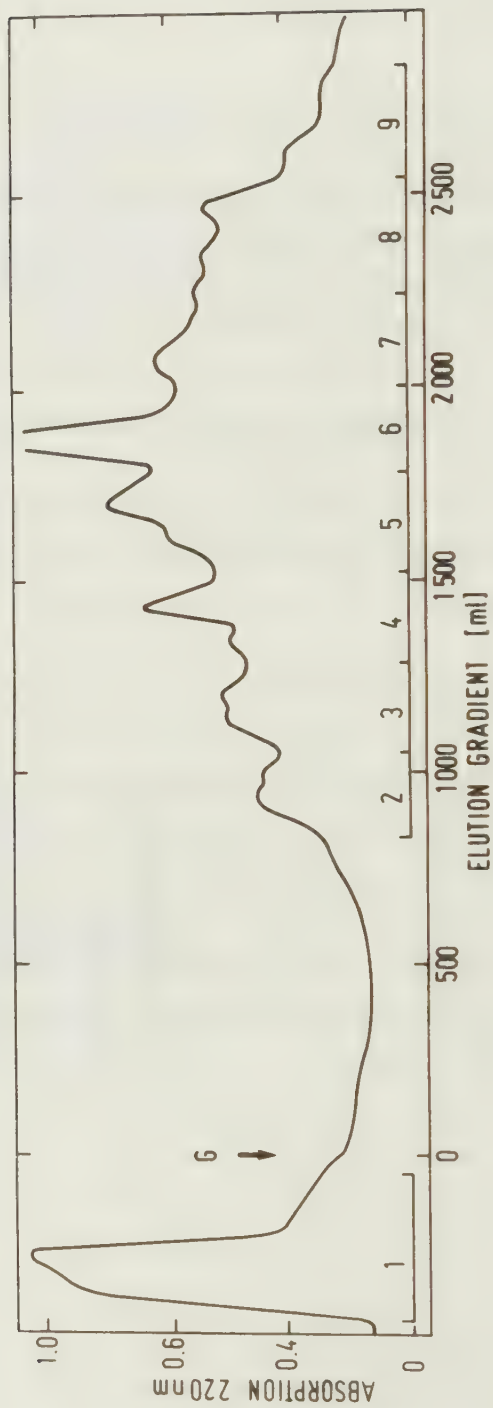


Abbildung 23: Auftrennung der Bromocyanpeptide von $\alpha(IV)$ aus Plazenta an CM-Cellulose.

0.004 M Natriumcitrat/HCl, pH 4,4; 2 M Harnstoff, 40°C; Säule 20x2,5 cm;

G Gradient 0 - 0,2 M NaCl in 2000 ml. Exp. T. 8.3.1.

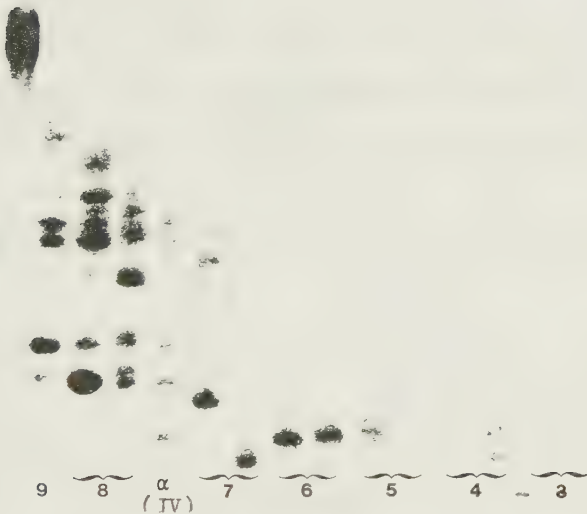


Abbildung 24: Untersuchung der Fraktionen der CMC-Chromatographie mittels Plattengelelektrophorese (Acrylamidkonzentration 15 - 25%). Die Zahlen entsprechen den Fraktionen in Abbildung 23.

Zwei Beispiele, bei denen eine Nachreinigung zur Isolierung reiner Peptide führte, sind in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt. Die Rechromatographie der Fraktion 2 in Abbildung 23 an Sephadex G 50s (=Abbildung 25) führt zu zwei reinen Peptiden, die in Peak a und b eluierten und mit 25a und 25b bezeichnet wurden. Die Auftrennung der Fraktion 6 in

Abbildung 23 ergab drei Peptide an Sephadex G 75s (=Abbildung 26), welche mit 26a, 26b und 26c bezeichnet wurden. Die Aminosäurezusammensetzungen sind in Tabelle 6 und die N-terminalen Sequenzen in Abbildung 32 gezeigt.

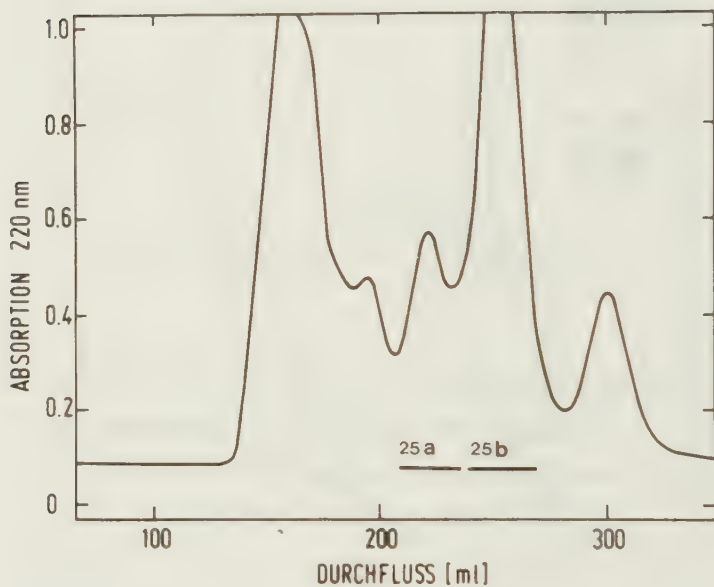


Abbildung 25: Chromatographische Reinigung der Fraktion 2 aus Abbildung 23 an Sephadex G 50s.
Laufmittel: 0,2 M NH_4HCO_3

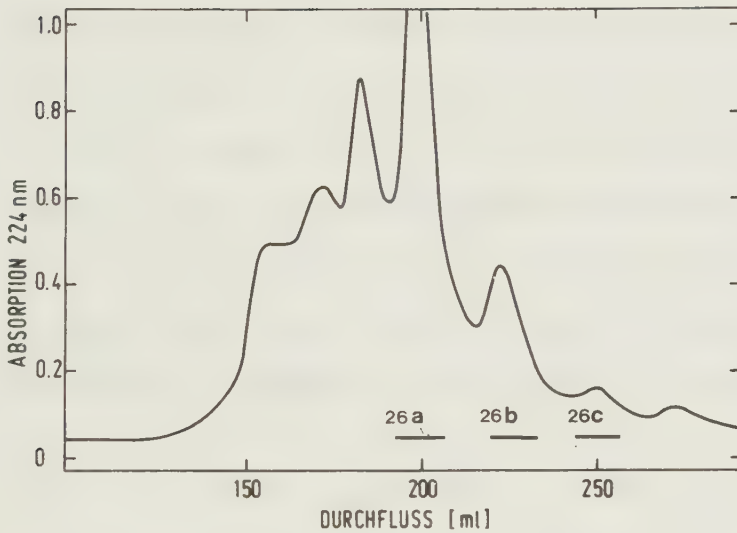


Abbildung 26: Chromatographische Reinigung der Fraktion 6 aus Abbildung 23 an Sephadex G 75s.

Laufmittel: 0,2 M NH_4HCO_3

Unter Verwendung von $\alpha 1(\text{III})\text{CB}3\text{A}$, $\alpha 1(\text{I})\text{CB}3$ und $\alpha 1(\text{I})\text{CB}8$ als Standards wurde eine Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt und dabei für 26a = 12 000 und für 26b = 7800 D erhalten.

5.3 Auftrennung der Bromcyanpeptide durch Gelchromatographie

Die CMC-Chromatographie scheint als erste Auftrennungsmethode nicht geeignet zu sein. Daher wurde in einem zweiten Ansatz Molekularsiebchromatographie für die Fraktionierung des Gesamtpeptidgemisches verwendet. Es wurden Sephadex G 75s und G 50s verwendet. Daher wurden vorwiegend Bromcyanpeptide mit einer Kettenlänge unter 80 Resten getrennt. Das folgende Bild zeigt die Chromatographie an Sephadex G 75s.

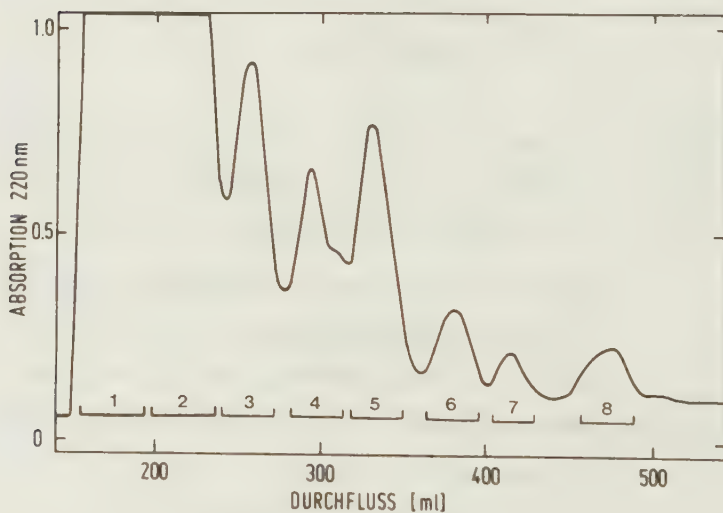


Abbildung 27: Gelchromatographische Trennung der Bromcyanpeptide der α (IV) Kette an Sephadex G 75s. Die Ziffern über den Balken bezeichnen die Fraktionen CB1-8. Die meisten dieser Fraktionen enthalten noch mehr als ein Bromcyanpeptid.

Jeder der Peaks CB1 - 8 enthielt noch mehrere Komponenten, weshalb mit Ionenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt wurde.

Bei der Trennung der mit CB3 bezeichneten Fraktion an CM-Cellulose (Abbildung 28) erwies sich Fraktion A als reines Peptid und an Phosphocellulose (Abbildung 29) wurden die Fraktionen a, b und c rein erhalten, was in den nächsten Bildern gezeigt wird. Eine Rechromatographie der Fraktion 5 (=Abbildung 27) auf CM-Cellulose ergab ebenfalls ein reines Peptid (Abbildung 30).

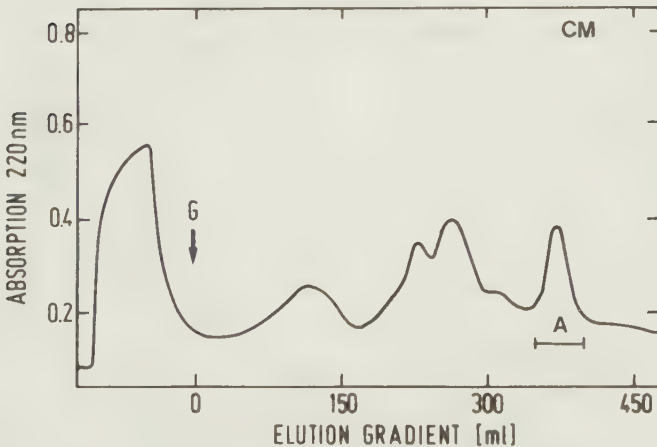


Abbildung 28: Chromatographie der Fraktion CB3 an CM-Cellulose; Bedingungen siehe Exp. Teil 8.3.1a. Von CB3A wurde die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminale Sequenz bestimmt.

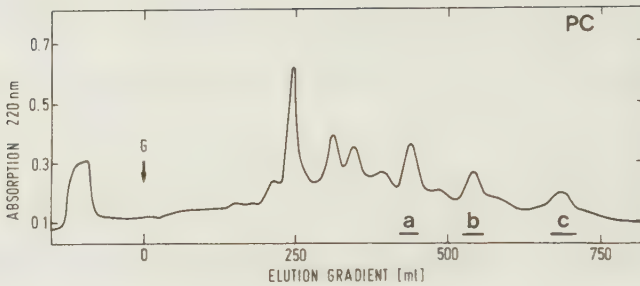


Abbildung 29: Chromatographie der Fraktion CB3 an Phosphocellulose; Bedingungen siehe Exp. Teil 8.3.1c. Von den Peptiden CB3a, b und c wurden die Aminosäurezusammensetzungen und die N-terminalen Sequenzen bestimmt.

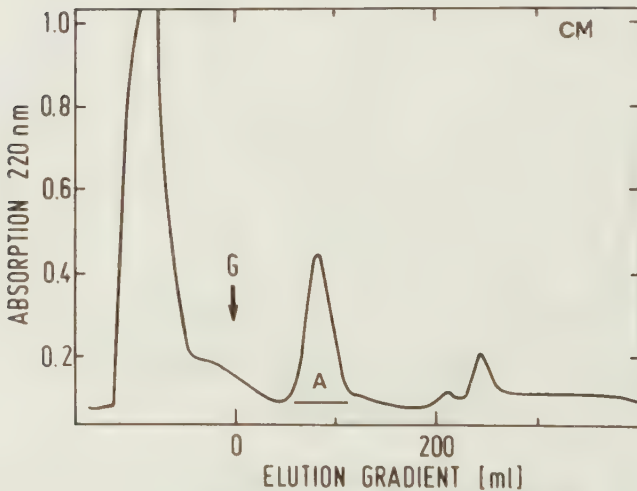


Abbildung 30: Chromatographie der Fraktion CB5 an CM-Cellulose; Von CB5A wurde die Aminosäurezusammensetzung und die N-terminale Sequenz bestimmt

Zwei zusätzliche Peptide wurden durch Chromatographie des Gesamtgemisches an Sephadex G 50s erhalten (Abbildung 31), wobei sich a und b ohne weitere Trennung als rein erwiesen. Alle so erhaltenen Bromcyanpeptide wurden durch Aminosäureanalyse (Tabelle 6) und Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz charakterisiert (Abbildung 33).

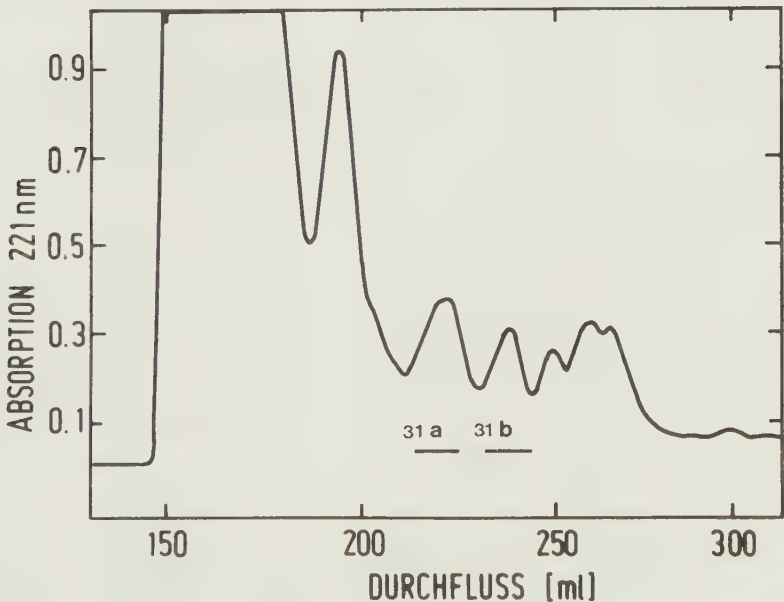


Abbildung 31: Chromatographische Auftrennung des Bromcyanpeptidgemisches von α (IV) an G 50s. Laufmittel: Natriumacetatpuffer; Temperatur 37°C . Von den Peptiden 31a und 31b wurden Aminosäurezusammensetzungen und die N-terminale Sequenz bestimmt.

	25a	101k	26b	Mol%	26c	Mol%	25a	Mol%	25b	Mol%	31a	Mol%	31b	Mol%	CB5A	Mol%	CB3A	Mol%	CB3a	Mol%	CB3b	Mol%	152c	
HYF	15,1	(12,7)	7,6	(9,7)	7,5	(13,6)	7,6	(13,1)	7,6	(13,1)	7,2	(12,1)	5,7	(12,6)	5,3	(14,6)	6,5	(14,8)	8,1	(13,0)	6,4	(12,1)	5,3	(10,0)
ASL	4,3	(4,1)	3,6	(4,6)	5,8	(10,5)	7,7	(13,3)	7,0	(12,7)	5,0	(8,4)	2,0	(4,2)	1,0	(2,7)	1,9	(4,3)	2,0	(3,2)	1,4	(2,6)	2,5	(4,7)
TRR	1,8	(1,5)	1,1	(1,4)	0,9	(1,6)	1,0	(1,7)	0,9	(1,7)	1,0	(1,7)	0,3	(2,0)	0,7	(1,9)	0,7	(1,6)	0,8	(1,3)	0,7	(1,3)	0,9	(1,7)
SEP	6,7	(5,7)	3,6	(4,6)	3,3	(6,0)	2,9	(5,0)	1,6	(2,9)	2,6	(4,4)	2,2	(4,9)	1,1	(3,0)	2,3	(5,2)	2,1	(3,4)	2,0	(3,8)	1,8	(3,4)
USE	1	(0,9)	1	(1,3)	1	(1,8)	1	(1,7)	1	(1,7)	1	(1,7)	1	(2,2)	1	(2,7)	1	(2,3)	1	(1,5)	1	(1,9)	1	(1,9)
GLU	2,0	(7,6)	8,9	(11,4)	2,8	(5,1)	4,6	(8,0)	3,8	(6,9)	5,0	(8,4)	4,8	(10,6)	4,3	(11,8)	3,7	(8,4)	6,4	(10,3)	6,6	(12,4)	6,1	(11,5)
PRO	2,1	(6,9)	5,9	(7,5)	3,9	(6,9)	5,0	(9,2)	7,8	(14,2)	4,7	(7,9)	2,6	(5,8)	4,3	(11,8)	4,0	(9,1)	4,6	(7,4)	4,8	(9,0)	5,6	(10,5)
GLY	23,0	(33,0)	25,0	(31,9)	17,0	(30,8)	16,0	(27,6)	14,0	(25,5)	18,0	(30,3)	14,0	(31,0)	11,0	(30,2)	14,0	(31,8)	21,0	(33,6)	18,0	(33,9)	18,0	(33,3)
ALA	4,3	(4,1)	3,5	(4,5)	1,5	(2,7)	1,8	(3,1)	1,9	(3,5)	2,6	(4,4)	2,5	(5,5)	1,2	(3,3)	1,1	(2,5)	2,6	(4,2)	2,1	(4,0)	2,0	(3,3)
VAL	5,4	(4,5)	1,6	(2,0)	2,6	(4,7)	1,7	(2,9)	2,0	(3,6)	2,5	(4,2)	0,9	(2,0)	0,2	(0,6)	1,5	(3,4)	1,1	(1,8)	1,1	(2,1)	1,4	(2,6)
ILE	3,2	(3,3)	4,3	(6,3)	0,5	(0,9)	2,2	(3,8)	0,9	(1,6)	1,4	(2,4)	1,9	(4,2)	0,6	(1,7)	0,9	(2,1)	4,1	(6,6)	3,3	(6,2)	2,1	(4,0)
LEU	7,2	(6,1)	2,9	(3,7)	2,8	(5,1)	1,7	(2,9)	2,2	(4)	3,0	(5,1)	3,0	(6,6)	2,7	(7,4)	2,1	(4,8)	2,5	(4,0)	1,7	(3,2)	1,2	(3,3)
TYR	9,6	(9,5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHE	3,2	(2,7)	0,8	(1,0)	0,2	(1,6)	0,2	(1,6)	0,9	(1,6)	0,9	(1,5)	1,0	(2,2)	0,3	(0,8)	0,6	(1,4)	0,8	(1,3)	0,5	(1,0)	-	-
HIS	-	-	-	-	0,8	(1,5)	0,5	(0,9)	0,7	(1,3)	0,5	(0,9)	-	-	0,5	(1,4)	0,5	(1,1)	-	-	-	-	-	-
HTC	6,3	(5,3)	6,9	(8,6)	3,0	(5,4)	2,4	(4,1)	2,0	(3,6)	2,5	(4,2)	2,1	(4,7)	1,2	(3,3)	2,3	(5,2)	3,9	(6,3)	3,3	(6,2)	4,0	(7,5)
LYS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	1,3	(1,1)	1,0	(1,3)	1,0	(1,8)	1,0	(1,7)	0,7	(1,3)	1,6	(2,7)	0,6	(1,3)	1,0	(2,7)	0,9	(2,0)	1,1	(1,8)	1,0	(1,9)	1,2	(2,3)
300672	118,1	-	78,3	-	55,2	-	58,0	-	55,0	-	59,5	-	45,2	-	36,4	-	44,0	-	62,1	-	53,9	-	53,1	-

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der Bromcyanpeptide, isoliert aus den Fraktionen 2 und 6 der Abbildung 23, gereinigt durch Gelchromatographie (dargestellt in Abbildung 25 bzw. 26), sowie den Peptiden aus den Fraktionen 3 und 5 der Abbildung 27, gereinigt durch CMC- bzw. PC-Chromatographie (dargestellt in den Abbildungen 28, 29 und 30. Zwei Peptide stammen aus Fraktionen der Abbildung 31. Die Berechnung basiert auf einem Homoserinrest pro Peptid (= Reste pro Peptid). Werte über 10 wurden auf- bzw. abgerundet, Werte kleiner als 0,2 wurden nicht angeschrieben. Korrekturen für instabile Aminosäuren wurden nicht vorgenommen. Werte in Klammern in Mol%.

26a

Hyp-Gly- X -Hyp-Gly-Leu-Gly-Gly- X -Pro-Gly- X -Val-Gly-Tyr-Hyp-Gly- X -Hyp-Gly-
⁵ ²⁵ ¹⁰ ³⁰ ¹⁵ ²⁰

Leu-Pro-Gly-Glu- Y -Gly-Asp- Y -Gly-Leu-Hyp-Gly

26b

Gly-Leu-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-Glu- Y -Gly-Val-Pro-Gly-Ile-Hyp-Gly-Pro-Gln-Gly- X -
⁵ ²⁵ ¹⁰ ³⁰ ¹⁵ ²⁰

Hyp-Gly-Leu-Pro-Gly-Asp-Gly-Gly- X - Y -Gly-
 Hyp

26c

Gly-Thr-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Gln-Hyp-Gly-Pro-Val-Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Glu-
⁵ ²⁵ ¹⁰ ¹⁵ ²⁰

X -Gly- -Hyp-Gly-Phe-Hyp-Gly-Phe-

25a

Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ile- Y -Gly-Val-Hyp-Gly-
⁵ ¹⁰ *

25b

Gly-Pro-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Ile-Asp-Gly-Val-Hyp-Gly-Asp-Hyp-Gly-Asn-Pro-Gly-Glu-
⁵ ²⁵ ¹⁰ ³⁰ ¹⁵ ²⁰

Hyp-Gly-Ala-Hyp-Gly-Val-Hyp-Gly-Pro- Y -Gly-Asp-

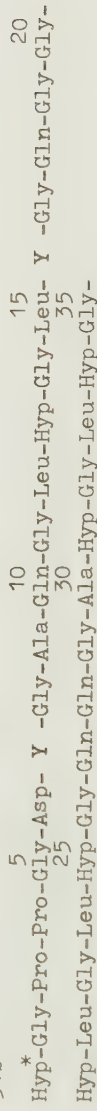
Abbildung 32: N-terminale Aminosäuresequenzen der BrCN-Peptide, isoliert aus Fraktion 2 bzw. 6 der CMC-Chromatographie (Abbildung 23) und gereinigt durch Gelchromatographie, dargestellt in Abbildung 25 bzw. 26. Die angeschriebenen X und Y stellen nicht identifizierte Aminosäuren dar. Hyp* bedeutet, daß auch Pro vorlag (Teilhydroxylierung).

Methode der Sequenzierung siehe 8.7.

31a



31b



CB5A



CB3A



CB3a



CB3b



CB3c

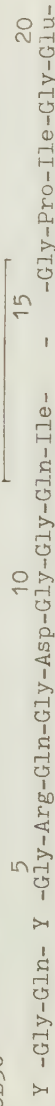


Abbildung 33: N-terminale Aminosäuresequenzen der BrCN-Peptide isoliert nach 5.4 bzw. 5.4.1. Die angeschriebenen X und Y stellen nicht identifizierte Aminosäuren dar.

Hyp* bedeutet, daß auch Pro vorlag. Aminosäuren als Ein-Buchstabensymbole an- geschrieben, konnten nicht sicher identifiziert werden. Nichtelikale Bereiche wurden durch Balken hervorgehoben. Methode der Sequenzierung siehe 8.7.

X/Y				
	$\alpha 1(I)$	$\alpha 2$	$\alpha 1(III)$	$\alpha (IV)^*$
4-Hyp	1 ^{a)} /111	0/67	0/143	1/38
Asp	16/14	2/6	9/18	9/1
Asn	7/6	9/5	6/15	1/-
Thr	2/14	4/7	6/8	2/1
Ser	15/20	13/8	27/17	1/-
Glu	42/8	20/3	44/2	4/0
Gln	7/17	8/11	9/15	5/5
Pro	116/4	68/3	99/2	9/12
Gly	1/1	-	15/2	2/5
Ala	64/61	33/32	46/37	4/2
Val	8/8	8/17	8/4	4/1
Met	2/5	0/4	5/4	1/-
Ile	4/4	6/6	9/4	4/-
Leu	18/1	19/3	15/1	18/2
Tyr	-	-	1/0	1/-
Phe	12/0	8/0	9/0	4/-
His	2/0	2/0	8/0	-
Hyl	0/4	0/7	0/4	-
Lys	12/20	5/3	12/21	-
Arg	9/42	7/29	8/47	2/-

a) 3-Hydroxyprolin

139 Pos.

Tabelle 7: Verteilung der Aminosäurereste auf den X und Y Positionen in Gly- X - Y von $\alpha 1(I)$, $\alpha 2$ und $\alpha 1(III)$ Ketten in Kalbshautkollagen (44) und $\alpha(IV)$ Ketten aus menschlicher Plazenta

* Es wurden nur tripelhelikale Strukturen ausgewertet.

Aus dem Bromcyanabbaugemisch wurden 12 Fragmente isoliert, deren N-terminale Sequenzen in den Abbildungen 32 und 33 wiedergegeben sind.

Ein Vergleich der Sequenzen ergab, daß einige Peptide, trotz chromatographischer Verschiedenheit, einen identischen N-Terminus besitzen. Dies gilt für die Peptidpaare 26c - 31a und 25a - 25b und für die drei Peptide 26b, CB3a und CB3b.

Verschiedenes chromatographisches Verhalten von Abbaupeptiden des Kollagens ist von den Arbeiten über interstitielles Kollagen her bekannt. Es wird zum Beispiel zurückgeführt auf unterschiedliche Hydroxylierung des Lysins oder auf verschiedene Besetzung der Hydroxylgruppen des Hydroxylysins mit Galactose- und Glucoseresten. Auch Desaminierung von Glutamin und Asparagin während der langen Isolierungsprozedur werden dafür verantwortlich gemacht.

Somit wurden 8 verschiedene Peptide isoliert, die nach ihrer Aminosäurezahl die Hälfte der α (IV) Kette darstellen. Von diesen 500 Aminosäuren wurden rund 250 Triplettspositionen sequenziert. Für einen Vergleich mit den interstitiellen Ketten wurden 160 X- und Y-Positionen in Gly- X - Y der α (IV) Kette und 139 identifizierte Aminosäuren herangezogen (Tabelle 7). Wie aus den Abbildungen 32 und 33 ersichtlich, konnten die Aminosäurereste (21 Positionen, davon 8 in X

und 13 in Y) in einigen Positionen nicht identifiziert werden. Den Gründen dafür wurde noch nicht nachgegangen. Es liegt aber die Vermutung nahe, daß es sich bei den Resten in Y-Positionen zum Teil um glykosyliertes Hydroxyl-lysin handelt, welches aufgrund der hydrophilen Kohlenhydratreste nicht auf dem üblichen Weg nach Abspaltung isoliert und identifiziert werden kann.

Bei interstitiellem Kollagen stellte es sich heraus, daß manche Aminosäuren nicht gleichmäßig auf den Positionen X und Y verteilt sind, sondern bevorzugt auf X oder Y konzentriert sind. Ein paar herausragende Beispiele sind die Argininreste, die vorwiegend in Position Y stehen, oder die Reste Phenylalanin und Leucin, die die X-Position bevorzugen. Wie in Tabelle 7 zu erkennen ist, folgt die Sequenz des Basalmembrankollagens nur bedingt diesen Tendenzen. Eine Aussage ist aber nur sehr beschränkt möglich, da die Auswertung von 1350 Aminosäureresten bei Typ I und III Kollagen 139 Resten bei Typ IV Kollagen gegenüberstehen.

Bei den α Ketten des Typ I und Typ II Kollagens besteht der tripelhelikale Bereich aus 1014 Aminosäureresten, d.h. aus 338 Tripeptideinheiten. Die Gly- X - Y Struktur der tripelhelikalen Bereiche ist in keinem Fall unterbrochen. Durch die Sequenzanalyse der α (IV) Kette ist es hier erstmals gelungen, Unterbrechungen der tripelhelikalen Struktur

aufzufinden. Die Peptide CB5A ab Glycin an 16. und CB3c ab Glycin an 11. Stelle haben eine durch 4 Aminosäuren unterbrochene Helixstruktur. In zwei weiteren Fällen, die hier nicht gezeigt wurden, traten ähnliche Unregelmäßigkeiten auf. Somit kommen zu den in der Abbildung 16 bereits aufgezeigten nichthelikalen Sequenzen am N-Terminus von $\alpha(\text{IV})$, $\alpha'(\text{IV})$, A und D weitere Beweise der makromolekularen Verschiedenheit des Typ IV Kollagens vom interstitiellen Kollagen. Diese strukturellen Verhältnisse können die Ursache für die Labilität des Basalmembrankollagens gegenüber Enzymen sein.

6. DISKUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit glaubte man, daß das Basalmembran-kollagen, ähnlich den interstitiellen Kollagenen in einer Vorstufe, der Pro- α Kette, synthetisiert wird. Zum Unterschied sollten aber die an beiden Enden befindlichen nicht-kollagenartig aufgebauten Domänen der Pro- α Ketten während der posttranslationalen Entwicklung nicht abgespalten werden, sondern die Prokollagenmoleküle als Ganzes in die extrazelluläre Matrix eingebaut werden. Zwei experimentelle Beobachtungen unterstützten diese Anschauung. Erstens entsteht bei limitiertem Pepsinabbau des Basalmembrankollagens eine den interstitiellen Kollagenen entsprechende α Kette als Hauptkomponente und zweitens wurde bei der Biosynthese des Basalmembrankollagens eine 160 kD große Kette beobachtet, die aber nicht in eine kleinere Stufe umgewandelt wird.

Aufgabe dieser Arbeit war es, die α kettenähnliche Komponente in größeren Quantitäten zu isolieren und erste vergleichende Untersuchungen mit den α Ketten der interstitiellen Kollagene anzustellen.

Die bisherigen Untersuchungen waren vorwiegend an isolierten Basalmembranen aus den Glomeruli der Niere oder der Linsenkapsel durchgeführt worden. Da diese Gewebe in nur geringen Mengen beschafft werden können, ging man hier von den leicht

zu erhaltenden basalmembranreichen Gewebe der menschlichen Plazenta aus, die aber den Nachteil hat, auch andere Typen von Gewebe zu enthalten.

Als Merkmal für typisches Basalmembrankollagen wurde die charakteristische Aminosäurezusammensetzung verwendet, die sich durch einen hohen Gehalt an glykosyliertem Hydroxylysin und an hydrophoben Aminosäuren auszeichnet.

Zur möglichst schonenden Gewinnung des Basalmembrankollagens wurde ein "Dreistufenverfahren" angewendet. Dazu wurde in einer ersten Stufe das Plazentagewebe durch möglichst schonende Pepsinbehandlung in Lösung gebracht, ohne dabei das empfindliche Basalmembrankollagen zu stark abzubauen. In einem zweiten Schritt wurde anschließend das interstitielle Kollagen entfernt. Das Basalmembrankollagen lag danach in einer hochmolekularen, durch Disulfidbrücken vernetzten Form vor. Da man glaubt, daß die nichtkollagenen Domänen des Basalmembrankollagens durch Disulfidbrücken dem proteolytischen Abbau entzogen werden, wurden zunächst die -S-S-Brücken reduziert und dann in einem dritten Schritt ein zweiter Pepsinabbau angeschlossen. Das dabei entstandene Basalmembrankollagen enthielt zwei Fraktionen, einen niedermolekularen Anteil, der sich im wesentlichen aus 290 - 260 nm langen tripelhelikalen Fragmenten zusammensetzte, und einer hochmolekularen Fraktion, die

durch Reduktion im denaturierten Zustand, teilweise in kleinere Einheiten übergeführt werden konnte.

Die 290 und 260 nm langen Fragmente, die als SLS-Kristallite ein völlig anderes Querstreifungsmuster und damit eine zum interstitiellen Kollagen differente Anordnung der polaren Aminosäuren zeigten, ergaben nach Denaturierung in der Hauptsache zwei Ketten mit Molekulargewichten von 95 kD und 70 kD, die mit α (IV) und α' (IV) bezeichnet wurden. Daneben treten je nach Intensität des Pepsinabbaus vier weitere kleinere Fragmente auf (A, B, C und D mit Molekulargewichten von etwa 46, 37, 27 und 19 kD). Nach Trennung durch Molekularsieb- und Ionenaustauschchromatographie zeigte die Charakterisierung der Ketten durch Bromcyanpeptidmuster sowie durch immunologische Methoden, daß diese α (IV) und die α' (IV) Ketten aus zwei genetisch verschiedenen Basalmembrankollagenmolekülen stammen müssen. Durch zeitliche Verfolgung des 2. Pepsinabbaus, bei dem beide Ketten zu verschiedenen Zeiten entstehen und wieder degradiert werden, konnte das Vorkommen beider Ketten in einem tripelhelikalen Molekül ausgeschlossen werden. Von den kleineren Peptidfragmenten konnte A der α' (IV) und B der α (IV) Kette zugeordnet werden. Aus dem Befund, daß die 140 kD große Kette, welche nach Reduktion aus dem hochmolekularen Anteil entstand, mit der α (IV) Kette immunologisch kreuzreagierte, konnte geschlos-

sen werden, daß im Basalmembrankollagen zwei Ketten vorhanden sind, die durch Pepsinabbau in zwei Reihen von verschieden großen Fragmenten übergehen.

Daß diese Ketten wirklich aus Basalmembranen stammen, konnte durch Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigt werden, wobei nur Basalmembranstrukturen und keine anderen Gewebe angefärbt wurden.

Die Sequenzuntersuchung einiger Bromcyanpeptide aus der α (IV) Kette, durch die etwa 250, wenn auch nicht zusammenhängende Sequenzen, aufgeklärt wurden, zeigte zunächst einen ähnlichen Aufbau wie er für das interstitielle Kollagen typisch ist. In zwei Fällen wurde aber eine Unterbrechung der Struktur (Gly- X - Y)_n gefunden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Basalmembrankollagen aus dem Mausemphysem gemacht (69). Wie oft diese Unregelmäßigkeiten auftreten, kann noch nicht gesagt werden. Desgleichen ist noch unklar, ob diese Unterbrechungen einen Knick in der Tripelhelix verursachen, wie es bei der kollagenen Domäne des Komplementfaktors C1q (61) beobachtet wurde. Es ist anzunehmen, daß diese Störungen wenigstens zum Teil für die Pepsinempfindlichkeit des Basalmembrankollagens verantwortlich sind.

Zur Frage, ob die Basalmembrankollagenketten in einer den

interstitiellen Kollagenen ähnlichen Pro- α Kette synthetisiert werden, konnten erste Anhaltspunkte gewonnen werden. Die Tatsache, daß die 140 kD-Kette aus der polymeren Fraktion, die ein ähnliches Molekulargewicht aufweist wie die Pro- α Kette, 33% Glycin enthält, und daß nach Abbau mit Kollagenase keine prokollagenähnlichen Fragmente mit Molekulargewichten zwischen 10 und 15 kD auftraten, spricht gegen diese Annahme.

Die Bearbeitung der cystinhaltigen polymeren Fraktion wird erweisen, ob die Basalmembranen weitere Ketten enthalten, die mit α (IV) und α' (IV) nicht verwandt sind. Nach Untersuchungen, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurden, scheint dies der Fall zu sein (50).

Faßt man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, konnten zwei neue Entdeckungen gemacht werden, erstens wurde gezeigt, daß Basalmembrankollagen mindestens zwei genetisch verschiedene Ketten enthält, und zweitens wurde die Unterbrechung der Tripletstruktur entlang der α (IV) Kette nachgewiesen.

Gegen Ende dieser Arbeit wurden Ergebnisse über Untersuchungen der Linsenkapsel und den Glomeruli der Niere und auch von Plazenta veröffentlicht (53,51,56,57,58), die ebenfalls zwei verschiedene Ketten aufzeigen, welche nach Molekulargewicht und Aminosäurezusammensetzung den hier

beschriebenen $\alpha(\text{IV})$ und $\alpha'(\text{IV})$ Ketten entsprechen.

Nach der Auffindung des grundlegenden Prinzips der Isolierung kollagener Komponenten aus der Basalmembran durch limitierten Pepsinabbau und chromatographische Reinigung sollten die Voraussetzungen für eine zügige Erforschung dieser Proteine gegeben sein. Ausgehend von der Untersuchung der Primärstruktur von $\alpha(\text{IV})$ sollten dann Zusammenhänge zwischen größeren und kleineren Peptiden erkennbar sein.

Spezifische Antikörper gegen kollagene Fragmente sollen schließlich Verteilungsstudien mittels der Immunfluoreszenz-methode in verschiedenen Geweben ermöglichen. Dabei wird sich dann zeigen, ob es wie beim interstitiellen Bindegewebe auch in der Gruppe der Basalmembrankollagene durch Variation der kollagenen Bestandteile zur Ausbildung der gewünschten Membraneigenschaften kommt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Charakterisierung von Basalmembrankollagen aus menschlicher Plazenta beschrieben.

- 1) Da Basalmembranen unter physiologischen Bedingungen unlöslich sind, wurden mit Pepsin die kollagenen Komponenten freigesetzt und unter nativen Bedingungen gereinigt und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Kollagen aus Basalmembranen stammt.
Ausarbeitung einer "3-Stufenmethode" (Pepsinbehandlung-Reduktion-Pepsinbehandlung).
- 2) Drei große Pepsinfragmente α (IV) (95 kD), α' (IV) (70 kD) und α'' (IV) (95 kD) konnten nach Denaturierung des nativen Typ IV Kollagens und chromatographischer Auftrennung isoliert werden. Durch Auffinden geeigneter Bedingungen für eine fraktionierte Salzfällung gelang es, die hochpolymeren Anteile von den Pepsinfragmenten zu trennen.
- 3) Nach Charakterisierung der Fragmente wurde gezeigt, daß α (IV) und α'' (IV) nahe verwandt sind.
 α' (IV) stellt mit großer Sicherheit eine genetisch distinkte Kette dar, die hier erstmals isoliert und beschrieben wurde.

- 4) Eine kinetische Untersuchung des 2. Pepsinabbaus zeigt Zusammenhänge zwischen Spaltungsbedingungen und den resultierenden kollagenen Fragmenten. Die Pepsinlabilität des Basalmembrankollagens wird deutlich erkannt.
- 5) Durch intensiveren Pepsinabbau werden bevorzugt kleinere Fragmente erhalten. A, B, C und D werden charakterisiert. B konnte eindeutig α (IV) zugeordnet werden.
- 6) Für die Bestimmung des Anteils an glykosyliertem Hydroxyl-
lysin wurde eine Methode ausgearbeitet, die eine Bestimmung der Komponenten mit dem Standardprogramm des Aminosäureanalysators Durrum D 500 ermöglicht.
- 7) α (IV) (95.000 D) Kette wurde mit Bromcyan gespalten. Grundlegende Versuche zeigen die Möglichkeiten der Auftrennung des Peptidgemisches auf. In diesem Zusammenhang wurde die Trennung der Peptide durch Gelchromatographie und anschließende Ionenaustauschchromatographie als der beste Weg erkannt.
- 8) Von den gereinigten Peptiden wurde mittels der automatischen Sequenzanalyse die N-terminale Aminosäurefolge bestimmt. Es wurden erstmals nichthelikale Bereiche innerhalb von Peptiden aufgefunden.
Alle bekannten Sequenzdaten des Typ IV Kollagens wurden

zum Vergleich der Besetzung der X- und Y-Positionen mit dem interstitiellen Kollagen herangezogen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung der chemischen und biochemischen Eigenschaften des Basalmembrankollagens stellen einen Beitrag zum Gesamtprojekt der Erforschung biochemischer und biologischer Daten von Basalmembranen dar. Diese grundlegenden Erkenntnisse sollen die Basis für weiterführende Studien der Biosynthese und des Abbaus von Basalmembrankomponenten in normalen und pathologischen Geweben sein.

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurde humane Plazenta wegen des großen Basalmembrangehalts und der relativ leichten Verfügbarkeit (Kreiskrankenhaus Pasing) gewählt.

Das Gewebe wurde nach der Geburt sofort tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurde von der Plazenta die Nabelschnur und entlang ihres Umfanges die fetalen Membranen abgeschnitten. Dem Zerhacken des Organs folgte die Auswaschung des Blutes mit 0,4 M Natriumacetatlösung. Zuletzt wurde mit 0,5 M Ameisensäure gewaschen, um einen geeigneten pH-Wert für die Pepsinbehandlung einzustellen.

8.2 Isolierung von Basalmembrankollagen

1. Pepsinabbau

10 kg feuchtes Gewebe wurden in 30 Liter 0,5 M Ameisensäure aufgeschwemmt und 1 g Pepsin (0,1%) (aus der Magenschleimhaut des Schweines 2500 Anson U/mg, Boehringer, Mannheim) in Lösung zugefügt. Nach einer Einwirkungsdauer von 16 - 20 Stunden bei 20°C wurde zentrifugiert und der feste

Rückstand verworfen. Die nun folgenden Arbeiten wurden bei 5°C im Kühlraum ausgeführt, um eine Denaturierung des Kollagens zu vermeiden. Das Zentrifugat wurde auf 6% Natriumchloridkonzentration gebracht. Nach Zentrifugation wurde der Rückstand in 10 Liter 0,03 M Tris/HCl-Puffer mit pH 7,6 und mit 0,2 M NaCl-Gehalt gelöst. Der pH-Wert veränderte sich und wurde mit NaOH-Lösung nachgestellt. Die Probe wurde dann in Dialyseschläuchen (Kalle, Wiesbaden) gegen denselben Puffer (mehrmaliger Wechsel) dialysiert, wobei einerseits das Pepsin inaktiviert und andererseits das überschüssige Natriumchlorid weggedialysiert wurden. Ein Niederschlag, der sich während der Dialyse bildete, mußte abzentrifugiert werden. Es folgte die fraktionierte Salzfällung mit 1,8 M NaCl. Um Typ I Kollagen vollständig zu entfernen, wurde dieser Schritt wiederholt. Die erforderlichen Zentrifugationen führte man mit 50.000 g eine Stunde lang aus.

Reduktion

Der Rückstand, noch verunreinigt mit wenig Typ III Kollagen, wurde in 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0, gelöst und der Lösung so viel 2-Mercaptoäthanol (Merck, Darmstadt) zugefügt, daß sie 0,02 molar war und inkubierte 20 Stunden bei 20°C. Anschließend wurden die Sulfhydrylgruppen durch Zugabe von 0,018 M Jodacetat (Serva, Heidelberg) carboxymethyliert, Dauer 1 Stunde bei 20°C. Die Probe wurde in Dialyse-

schläuche gefüllt und gegen 0,5 M Ameisensäure dialysiert. Die Dialyseflüssigkeit wurde mehrmals gewechselt, um die überschüssigen Reagentien zu entfernen.

2. Pepsinabbau

Es erfolgte ein 2. Pepsinabbau durch Zugabe von 1 mg Pepsin pro 1 g Naßgewicht des mit 1,8 M NaCl gefällten Niederschlages. Nach 16 - 20 Stunden Dauer der enzymatischen Behandlung wurde mit 6% NaCl das gesamte Kollagen ausgefällt.

Für den Versuch der zeitlichen Verfolgung des 2. Pepsinabbaus wurden zu bestimmten Zeiten Proben der Aufarbeitung entnommen und zur Abstopfung der Enzymreaktion gegen 0,2 M NH_4HCO_3 dialysiert. Nach Dialyse wurden die Proben mittels Diskelektrophorese untersucht.

Entfernung der polymeren Aggregate durch denaturierte Fällung.

Der Rückstand der Salzfällung des 2. Pepsinabbaus wurde in 0,03 M Tris/HCl, pH 7,4, umdialysiert und bei 45°C 1 Stunde denaturiert. Die Lösung wurde auf 3 M NaCl gebracht und über Nacht im Kühlraum gerührt. Dabei fielen die polymeren Aggregate aus und konnten durch Zentrifugieren entfernt werden.

8.3 Chromatographische Verfahren

Zur Durchführung der Trennungen wurden Kunststoff- oder Glassäulen, mit Mantel zwecks Kühlung oder Erwärmung, verwendet. Zur Erhaltung eines konstanten Durchflusses wurde die Probe durch die Säule gepumpt (PERPEX^r, LKB, Schweden). Die Säuleneluate werden kontinuierlich (Durchflußküvette) von einem Spektralphotometer (der Firmen Beckman, Cecil, Gilford) bei Wellenlängen von 220 - 240 nm vermessen und die erhaltenen Extinktionen durch Schreiber (Beckman, W + W) aufgezeichnet. Die Eluate werden durch Fraktionssammler (Ultro-Rac, LKB, Schweden) gesammelt.

8.3.1 Ionenaustauschchromatographie

a) Carboxymethyl-Cellulose (CM-Cellulose)

Hersteller: Whatman, England; CM 52, micro-granular (pre-swollen)

Die Trennung erfolgte in Säulen von 15 x 1,6 cm und 20 x 5 cm. Zur Auftrennung von nativem Kollagen bzw. denaturierten Ketten wurde mit Leitungswasser gekühlt (15°C) bzw. die Säule mittels Wasserbad auf 40°C erwärmt. Äquibriert waren die Säulen mit 0,04 M Natriumacetat, pH 4,8, und 2 M Harnstoff. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,2 M NaCl in 4000 ml des genannten Puffers.

Die BrCN-Peptide wurden durch folgende Bedingungen getrennt:
0,004 M Natriumacetat/HCl, pH 4,4, 2 M Harnstoff; Temperatur 40°C; Gradient 0 - 0,15 M NaCl in 4000 ml.

b) Diäthylaminoäthyl-Cellulose (DEAE-Cellulose)

Hersteller: Whatman, England; DE-52, microgranular (pre-swollen)

Die Trennung erfolgte in Säulen von 20 x 5 cm unter Kühlung (15°C). Laufpuffer: 0,03 M Tris/HCl, pH 8,6, 0,2 M NaCl, 2 M Harnstoff.

Da natives Kollagen die Säulen leicht verstopfen kann, wurde auch ein Batch-Verfahren angewandt.

Für 2,5 g Probe/1000 ml wurden 100 ml in Startpuffer suspendierte DE-Cellulose verwendet. Es wurde 4 Stunden gerührt, dann abgenutscht und nachgespült. Die adsorbierten Substanzen werden mit 1 M NaCl abgelöst.

c) Phosphocellulose (PC)

Hersteller: Whatman, England; P-11 fibrous powder form

Die Chromatographie erfolgte in einer Säule von 1,6 x 14 cm. Temperatur 40°C. Durchfluß 80 ml pro Stunde. Äquilibriert

war die Säule mit 0,005 M Natriumacetatpuffer, pH 3,6.
Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,6 M
NaCl in 2000 ml.

8.3.2 Molekularsiebchromatographie

a) Bio-Gel A 1,5 (200 - 400 mesh), spär. Agarose-
gel 8%

Hersteller: Bio-Rad-Laboratories, Calif., USA.

Die Chromatographie wurde in Säulen von 2, 3,5 und
5 x 150 cm durchgeführt. Als Laufmittel diente Puffer mit
der folgenden Zusammensetzung: 1 M CaCl_2 , 0,05 M Tris/HCl,
pH 7,5.

Der Puffer wurde vor der Verwendung mit Aktivkohle geklärt.
Durchflußgeschwindigkeit entsprechend der Säulendurchmesser
20, 35 und 60 ml pro Stunde.

b) Sephadex G 50, G 75, G 100 superfine

Hersteller: Pharmacia, Schweden.

Säulenabmessungen 2 x 150 cm. Als Laufmittel wurde 0,2 M
Ammoniumbicarbonat- oder 0,03 M Natriumacetatpuffer ver-
wendet. Die Säulen mit Natriumacetat als Laufmittel wurden
auf 40°C thermostatisiert.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug für G 50 und G 75
18 ml pro Stunde und für G 100 6 ml/Stunde.

c) Bio-Gel P-2 (100 - 200 mesh), sphär. Polyacrylamidgele

Hersteller: Bio-Rad-Laboratories, Calif., USA.

Mit dieser Chromatographie wurden Peptidlösungen entsalzt.

Laufmittel: 0,1 M Essigsäure. Für verschiedene Proben-
volumina wurden Säulen mit unterschiedlichen Dimensionen
verwendet: 3 x 25 cm 15 - 20 ml Probe

3,5 x 30 cm bis 120 ml

5 x 35 cm bis 200 ml

5 x 50 cm bis 300 ml

d) Bio-Gel P-4 (200 - 400 mesh), sphär. Polyacrylamidgele

Hersteller: Bio-Rad-Laboratories, Calif., USA.

Laufmittel: 0,1 M Essigsäure; Säulendimension 150 x 1,5 cm.

Durchflußgeschwindigkeit: 18 ml pro Stunde.

8.4 Polyacrylamidgel-Elektrophorese in SDS

8.4.1 SDS-Diskelektrophorese

Für die Diskelektrophorese wurden 6 oder 8 cm lange Gele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 5 - 7,5% verwendet. Zusammensetzung des Kammerpuffers: 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,2, und 0,1% SDS. Zum Probenauftrag wurde 20 - 40 µg Peptidgemisch in 5 - 15 µl 0,1 Natriumphosphat-

puffer, pH 7,0, 0,2% SDS, 4 M Harnstoff gelöst und 30 min bei 45°C denaturiert. Die Trennung erfolgte bei 6,5 mA pro Gel. Laufrichtung zur Anode. Anfärbung und Fixierung wurde mit folgender Lösung durchgeführt: 2,2 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg), 80 ml Eisessig, 100 g Trichloressigsäure, 400 ml Äthanol und Wasser ad 1000 ml.

Nach einer Stunde Färbebad wurde durch mehrfaches Waschen mit 7,5% Essigsäurelösung entfärbt.

8.4.2 SDS-Plattengelelektrophorese

Es wurden Plattengele nach Laemmli (63) hergestellt. Die Gele bestanden aus Probenauftragsgel (Obergel, 14 x 14 x 0,15 cm) und dem Trenngel (14 x 14 x 0,15 cm). Das Obergel hatte eine Acrylamidkonzentration von 4,5%/0,05% N,N'-bis-Methylenacrylamid in 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% SDS (Dodecylsulfat-Natriumsalz), 0,08% Tetramethyläthylen-diamin (TEMED), 0,035% Ammoniumpersulfat. Zur Herstellung des Trenngels wurde entweder 7,5% Acrylamidlösung/0,1% bis-Acrylamid in 0,4 M Tris/HCl mit pH 8,8, 0,1% SDS, 0,06% TEMED, 0,025% Ammoniumpersulfat konstant, verwendet, oder es wurde ein linearer Gradient mit einer Acrylamidkonzentration von 15 - 25% hergestellt. 15% Acrylamid/0,2% bis-Acrylamid in 0,4 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,03% TEMED und 0,0125% Ammoniumpersulfat; 25% Acrylamid/0,4% bis-Acrylamid in 0,4 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,01%

TEMED, 0,006% Ammoniumpersulfat.

Als Elektrodenpuffer (pH 8,3) wurde 0,025 M Tris und 0,192 M Glycin und 0,1% SDS verwendet.

Die Anfärbung und Entfärbung erfolgte in der für die Diskgele beschriebenen Weise. Probenpuffer: 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercapto-äthanol, 0,001% Bromphenolblau. Probenauftragsmenge: 50 - 150 µg in 5 - 15 µl.

Die Laufspannung betrug 100 Volt (ca. 12 Stunden Laufzeit) oder 250 Volt (ca. 6 Stunden).

8.5 Präparation von Segment-long-spacing Kristalliten (36)

Native Kollagenproben (1 mg/ml) werden in 1% Essigsäure gegen 0,4% ATP, pH 2,8, dialysiert. Die Positiv-Färbung der SLS-Kristalliten wurde mit 0,5% Phosphorwolframsäure, pH 3,5, und 1% Uranylacetat, die Negativ-Färbung mit 2% Phosphorwolframsäure, pH 7,4, durchgeführt. Untersucht wurden die Proben mit dem Elektronenmikroskop von Siemens, Elmisko 1A.

8.6. Molekulargewichtsbestimmung

8.6.1 Gelchromatographie

Die Molekulargewichte der Fragmente A, B, C, D wurden durch Chromatographie auf Bio-Gel A 1,5 (Säule 2,5 x 140); 1 M CaCl₂, 0,05 Tris/HCl, pH 7,5) bestimmt. Zur Aufstellung

der Eichkurve wurden Testläufe mit kollagenen Peptiden, deren Molekulargewichte bekannt sind, durchgeführt: $\alpha 1(\text{III})\text{CB}5$ (22.000 D), $\alpha 1(\text{III})\text{CB} 9\text{B}$ monomer (8.800 D), $\alpha 1(\text{I})$, $\beta\alpha(\text{I})$. Die Logarithmen der Molekulargewichte sind linear proportional zu V/V_0 . V ist das Elutionsvolumen der Substanz, V_0 ist das Ausschlußvolumen der Säule.

8.6.2 SDS-Diskelektrophorese

Die Polyacrylamidkonzentration betrug 7,5%. Als Standards für die Aufstellung der Eichkurve wurden verwendet: CB-Peptide von $\alpha 1(\text{I})\alpha 2$ mit den Molekulargewichten nach (38), und $\alpha 1(\text{I})$. Die Auswertung erfolgte graphisch, und zwar Logarithmus des Molekulargewichtes gegen Laufstrecke in mm im Gel.

8.7 Sequenzierung (64,65)

Die Sequenzanalyse der Peptide wurde nach Edman und Begg in einem "Protein-Peptid-Sequencer" der Fa. Beckman Instruments, Palo Alto, Calif., USA, durchgeführt.

Zur Durchführung wurde ein "Protein-Quadrol-Programm" mit 0,5 M Quadrol (Modell 890B Programm 060275, Modell 890C Programm 122974) verwendet.

Alle Reagentien wurden von Beckman bezogen.

Die derivatisierten Aminosäuren (Thiazolinon-Aminosäuren) wurden automatisch in die Phenylthiohydantoin (=PTH)-Aminosäuren konvertiert, und zwar durch Verwendung von alkoholischer HCl in einem P6-Autoconverter (Sequemat Inc., Watertown, Mass., USA). Programm und Reagentien wie im Autoconverter Manual beschrieben.

Identifizierung

Die einzelnen PTH-Aminosäuren wurden durch folgende Methoden identifiziert:

Dünnschichtchromatographie; HPTLC Fertigplatten, Kieselgel F254, Merck, Darmstadt. 2 Laufmittelsysteme: a) tert. Propionsäurebutylester; b) 120 ml Dichloräthan + 28 ml Eisessig.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie: SP 8000 Liquid Chromatograph, Spectra-Physics, Darmstadt. Säule Hibar (0,4 x 25 cm) LiChrosorb^R RP-18 (5 µm), Merck, Darmstadt. a) Puffer: 0,01 M Natriumacetat, pH 4,1, Methanolgradient, Temperatur 60°C; b) Gaschromatographie; 5700 A Gas Chromatograph, Hewlett-Packard mit Autosampler. Trägergas Helium, Detektor: Flammenionisationsdetektor, Säulenmaterial 10% SP - 400 Chromosorb WHP 100/120, Supelco Inc. ict HandelsGmbH, Frankfurt; Temperaturgradient 200 - 300°C.

8.8 Bromcyanspaltung

Vor der eigentlichen Spaltungsreaktion wurde eine Reduktion des Methioninsulfoxids nach (42) durchgeführt. Das Protein

wurde in 0,2 M NH_4HCO_3 , 25%ig an Mercaptoäthanol gelöst und bei 45°C 20 Stunden inkubiert. Nach gelchromatographischer Entsalzung über P 2 wurde gefriergetrocknet.

Das reduzierte Protein wurde in 70%-iger Ameisensäure gelöst (5 mg/ml) und 30 Minuten bei 45°C inkubiert. Sodann wurde der Ansatz mit Stickstoff begast und BrCN im Verhältnis von 1:1 - Protein:BrCN zugesetzt. Es wurde durch Sublimation gereinigtes BrCN verwendet. Nach 4 Stunden Inkubation bei 30°C im Wasserbad wurde der Ansatz zur Trockene eingeengt.

8.9 Aminosäureanalysen

0,2 - 0,5 mg Protein wurden mit 1 ml 6 N HCl versetzt und 24 Stunden bei 110°C unter Stickstoff hydrolysiert. Die Proben wurden anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Homoserinhaltige Peptide wurden nach dem Eindampfen 1 Stunde mit 1 ml 1%-iger Piperidinlösung bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um den Homoserinlaktongring wieder zu öffnen. Die Analysen wurden mittels eines Einsäulenverfahrens an einem automatischen Aminosäureanalysator, DURRUM D 500, der Fa. Durrum, Palo Alto, Calif., USA, durchgeführt.

8.10 Bestimmung von Hydroxylysin und Hydroxylysinglykosiden

1 - 5 mg Protein wurden mit 0,5 ml 2 N NaOH in einem Eppen-

dorf-Reaktionsgefäß unter N_2 in einem Reagenzglas eingeschmolzen und 24 Stunden bei $110^{\circ}C$ hydrolysiert (66,67,68). Das Hydrolysat wurde mit 2 N HCl genau neutralisiert und über eine "Ion Retardation Resin"-Säule AG 11 A8 (60 x 1 cm) (Bio-Rad-Laboratories, Calif., USA) größtenteils vom Salz befreit.

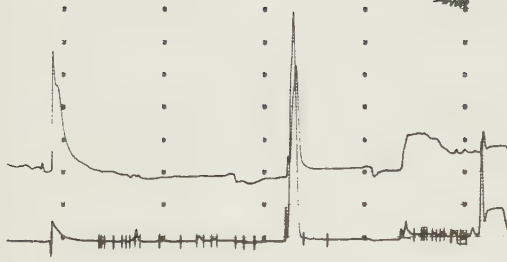
Das Hydrolysat wurde nun auf einem Aminosäurehydrolysator DURRUM D 500 (Programm wie für normale saure Hydrolyse) aufgetrennt.

Herstellung der Standards: Der im Handel käufliche Meereschwamm wurde mit 2 N NaOH unter N_2 bei $110^{\circ}C$ hydrolysiert, teilentsalzt auf AG 11 A 8 Säule und das Disaccharid (Glykosylgalaktosylhydroxylysin) durch F2-Chromatographie isoliert. Die Herstellung des Monosaccharides (Galaktosylhydroxylysin) erfolgte durch Hydrolyse des Disaccharides mit 0,2 N HCl, 4 Stunden bei $100^{\circ}C$.

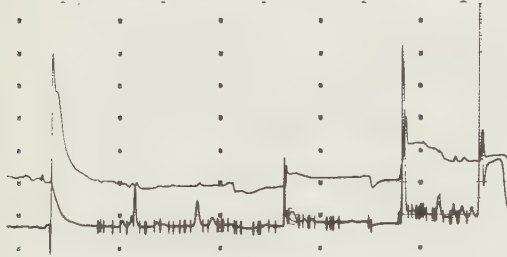
Eine quantitative Auswertungsmöglichkeit besteht durch die Bestimmung der Ninhydrinfarbwerte der glykosylierten Hydroxylysinmoleküle. Da die Farbwerte der Aminosäuren von verschiedenen Bedingungen (Puffer, Ninhydrinlösung etc.) abhängig sind und im normalen Testprogramm kein glykosyliertes Hydroxylysin vorhanden ist, wurden die Farbwerte von Glukosylgalaktosyl- und Galaktosylhydroxylysin auf Farbwerte von Aminosäuren im Testprogramm bezogen. Die Einführung von Faktoren ermöglichte die Umrechnung.

Abbildung 32:

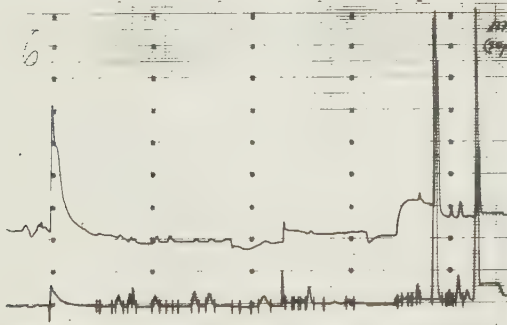
Chromatogramme der Auf-
trennung des DURRUM D 500
Aminosäureanalysators



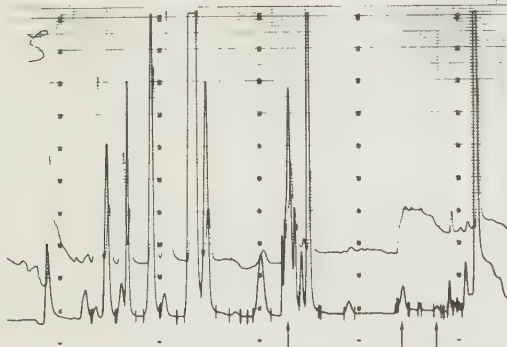
A Glukosylgalaktosylhydroxy-
lysin



B Galaktosylhydroxylysin



C Hydroxylysin



alkalisches Hydrolysat

A B C

Glukosylgalaktosylhydroxylysin:

$$\text{nM} = \frac{\text{Area} \times 500 \times 1,15}{\text{Factor Hyl}}$$

Galaktosylhydroxylysin:

$$\text{nM} = \frac{\text{Area} \times 500 \times 1,05}{\text{Factor Met}}$$

Die Formeln gelten nur für das normale Aminosäuretrennprogramm mit 5 nM pro Aminosäure im Testprogramm.

Die ermittelten Faktoren von 1,15 und 1,05 zeigen gute Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten (67).

Durch diese Methode war es nun möglich, mit dem normalen DURRUM-Programm für Aminosäuren die Mengen an glykosyliertem Hydroxylysin zu bestimmen.

9. LITERATUR

- 1 Piez, K. A.
 In Treatise on Collagen; (Ramachandran, G. N., editor)
 Vol. I, pp. 207 - 252, Academic Press, New York, 1967

- 2 Kühn, K.
 The structure of collagen; Essays in Biochemistry, Vol. 5
 (Cambell, P. N. & Greville, G. D., eds.) Academic Press,
 London & New York, pp. 59 - 87, 1969

- 3 Miller, E. J., Epstein, E. H. Jr. and Piez, K. A.
 Identification of three genetically distinct collagens
 by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin
 and cartilage collagen
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1024, 1971

- 4 Rauterberg, J. and Bassewitz, D. v.
 Segment-Long-Spacing Crystallites of Typ III Collagen
 from Calf Aorta and Fetal Calf Skin
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 95, 1975

- 5 Fietzek, P. P. and Kühn, K.
 The Primary Structure of Collagen
 Int. Rev. Connect. Tissue Res. 7, 1 - 60, 1976

- 6 Traub, W. and Piez, K. A.
 The chemistry and structure of collagen
 Adv. Prot. Chem. 25, 243, 1971

- 7 Sabakibara, S., Inouye, K., Shudo, K., Kishida, Y., Kobayaski, Y. and Prockop, D. J.
Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)_n of Defined Molecular Weights
Evidence for the Stabilisation of Collagen Triple Helix
by Hydroxyprolin
Biochem. Biophys. Acta 303, 198, 1973
- 8 Hofman, H., Fietzek, P. and Kühn, K.
The Role of Polar and Hydrophobic Interactions for the
Molecular Packing of Typ I Collagen: A Threedimensional
Evaluation of the Amino Acid Sequence
J. Mol. Biol. 125, 137, 1978
- 9 Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L. and
Guzman, N.
The Biosynthesis of Collagen and its Disorders
Part I+II
N. Engl. J. Med. 301, 13 + 77, 1979
- 10 Fessler, J. H. and Fessler L. I.
Biosynthesis of Procollagen
Ann. Rev. Biochem. 47, 129, 1978
- 11 Blobel, G. and Dobberstein, B.
Transfer of Proteins Across Membranes
J. Biol. Chem. 67, 835, 1975
- 12 Graves, P. N., Olson, B. R., Fietzek, P. P., Monson, J.
and Prockop, D. J.
Typ I Pre-Procollagen Chains Synthesized in a Messenger
RNA Dependent Reticulocyte Lysate
Fed. Proc. 38, 620, 1979

- 13 Fiedzek, P. P.
Persönliche Mitteilung
- 14 Tanzer, M. L.
Cross-Linking of Collagen
Science 180, 562, 1973
- 15 Kühn, K.
Einige Beispiele zur Pathobiochemie des Kollagenstoff-
wechsels
Aktuelle Probleme der Pathobiochemie
Ed. Lang H. et al.; Springer Verlag, Seite 55, 1977
- 16 Kefalides, N. A.
Structure and Biosynthesis of Basement Membranes
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 6, 63 - 104, 1973
- 17 Farquhar, M. G.
Structure and Function in Glomerular Capillaries
Biology and Chemistry of Basement Membranes (ed.
N. A. Kefalides), Academic Press 43, 1978
- 18 Vracko, R.
Basal Lamina Scaffold
Front. Matrix Biology 7, 78, 1979
- 19 Hudson, B. G and Spiro, R. G.
Fractionation of Glycoprotein Components of the Reduced
Alkylated Renal Glomerular Basement Membrane
J. Biol. Chem. 247, 4239, 1972

- 20 Kefalides, N. A.
Isolation of a Collagen from Basement Membranes containing three identical α Chains
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 226, 1971
- 21 Timpl. R.
Chemical and Immunological Studies on Basement Membrane Collagen from a Murine Tumor
Biology and Chemistry of Basement Membranes (ed. N. A. Kefalides), Academic Press 413, 1978
- 22 Heathcote, J. G., Sear, C. H. and Grant, M. E.
Biosynthesis of Rat Lens Capsule Collagen - Biology and Chemistry of Basement Membranes (ed. N. A. Kefalides), Academic Press 335, 1978
- 23 Jaffe, E. A., Minnick, R. L. et al.
Synthesis of Basement Membrane Collagens by Cultured Human Endothelial Cells
J. Exp. Med. 144, 209, 1976
- 24 Clark, C. C. and Kefalides, N. A.
Comparison of Newly Synthesized Basement Membrane Procollagen to Interstitial Typ I Procollagen
Biology and Chemistry of Basement Membranes (ed. N. A. Kefalides), Academic Press 287, 1978
- 25 Timpl. R., Martin, R. G., Bruckner, P., Wick, G. and Wiedemann, H.
Nature of the Collagenous Protein in a Tumor Basement Membrane
Eur. J. Biochem. 84, 43, 1978

- 26 Timpl, R. and Rhode, H. et al.
Laminin - A Glycoprotein from Basement Membranes
J. Biol. Chem. 254, 9933, 1979
- 27 Farquhar, M. G. and Kanwar, Y. S.
Presence of heparan sulfate in the glomerular basement
membrane
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1303, 1979
- 28 Burgeson, R. E., El Aldi, F. A., Kaitila, I. I. and
Hollister, D. W.
Fetal membrane collagens: Identification of two collagen
alpha chains
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2579, 1976
- 29 Bentz, H., Bächinger, H.-P., Glanville, R. and Kühn, K.
Physical Evidence for the Assembly of A and B Chains
of Human Placental Collagens in A single Triple Helix
Eur. J. Biochem. 92, 563, 1978
- 30 Von der Mark, H. and von der Mark, K.
Isolation and Charakterization of Collagen A and B
Chains from Chick Embryos
FEBS Lett. 99, 101, 1979
- 31 Deyl, Z., Macek, K. and Adam, M.
Collagen A and B Chains Constitute Two Separate
Molecular Species
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 866, 1979

- 32 Rhodes, R. K., Miller, E. J.
Physicochemical Characterization and Molecular
Organization of the Collagen A and B Chains
Biochemistry 17, 3442, 1978
- 33 Von der Mark, K.
Persönliche Mitteilung
- 34 Uitto, J.
Collagen Polymorphism: Isolation and Partial Characteri-
zation of $\alpha 1(I)$ Trimer Molecules in Human Skin
Arch. Biochem. Biophys. 192, 371, 1979
- 35 Gross, J. and Nagai, Y.
Specific degradation of collagen molecule by tadpole
collagenolytic enzyme
Pro. Nat. Acad. Sci. USA 54, 1197, 1965
- 36 Stark, H. and Kühn, K.
Molecular fragments of rat skin collagen obtained on
collagenase digestion
Eur. J. Biochem. 6, 542, 1968
- 37 Rauterberg, J. and Kühn, K.
Electronmicroscopic method of ordering the cyanogen
bromide peptides of the $\alpha 1$ chain from acid-soluble
calf-skin collagen
FEBS Lett. 1, 230, 1968

- 38 Rauterberg, J. and Kühn, K.
Acid Soluble Calf Skin Collagen
Eur. J. Biochem. 19, 398, 1971
- 39 Timpl, R.
Immunological Studies on Collagen
Biochemistry of Collagen (Ed. by G. N. Ramachandran
and A. H. Reddi) 319, 1976; Plenum Publishing Co.,
New York
- 40 Rohde, H., Nowack, H., Becker, U. and Timpl, R.
Radioimmunoassay for the Aminoterminal Peptide of
Procollagen $\alpha 1(I)$ -Chain
J. Immunol. Methods 11, 135, 1976
- 41 Lawson, W. B., Gross, E., Folk, C. M. and Witkop, B.
Specific Cleavage of Methionyl Peptides
J. Am. Chem. 83, 1509, 1961
- 42 Adelstein, R. S. and Kuehl, M. W.
Structural Studies on Rabbit Skeletal Actin. I.
Isolation and Characterization of the Peptides Produced
by Cyanogen Bromide Cleavage
Biochemistry 9, 1355, 1970
- 43 Bornstein, P. and Piez, K. A.
Collagen: Structural Studies Based on the Cleavage of
Methionyl Bonds
Science 148, 1353, 1965

- 44 Glanville, R. W. and Kühn, K.
The Primary Structure of Collagen; at Int. Conference
on Fibrous Proteins - New Zealand 12. - 16. Febr. 1979
- 45 Tryggvason, K., Risteli, J. and Kivirikko, K. I.
Separation of prolyl 3-hydroxylase and 4-hydroxylase
activities and the 4-hydroxyprolin requirement for
synthesis of 3-hydroxyprolin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 275, 1977
- 46 Daniels, J. R. and Chu, G. H.
Basement Membrane Collagen of Renal Glomerulus
J. Biol. Chem. 250, 3531, 1975
- 47 Hudson, G. B. and Spiro, R. G.
Studies on the Native and Reduced Alkylated Renal
Glomerular Basement Membrane
J. Biol. Chem. 247, 4229, 1972
- 48 Timpl, R., Bruckner, P and Fietzek, P.
Characterization of Pepsin Fragments of Basement Membrane
Collagen Obtained from a Mouse Tumor
Eur. J. Biochem. 95, 255, 1979
- 49 Glanville, R. W and Kühn, K.
Preparation of Two Basement Membrane Collagens from
Human Placenta
Proc. Symp. Basement Membranes (Paris, Oct. 1977)
Front. Matrix Biol. 7, 19, 1979

- 50 Risteli, J.
Persönliche Mitteilung
- 51 Bailey, A. J., Sims, T. J., Duance, V. C. and Light, N. D.
Partial Characterization of Second Basement Membrane
Collagen in Human Placenta
FEBS Lett. 99, 361, 1979
- 52 Dehm, P. and Kefalides, N. A.
The Collagenous Component of Lens Basement Membrane
J. Biol. Chem. 253, 6680, 1978
- 53 Gay, S. and Miller, E. J.
Characterization of Lens Capsule Collagen: Evidence
for the Presence of Two unique Chains in Molecules
Derived from Major Basement Membrane Structures
Eur. J. in press
- 54 Tryggvason, K. and Kivirikko, K. I.
Heterogeneity of Pepsin-Solubilized Human Glomerular
Basement Membrane Collagen
Nephron 21, 230, 1978
- 55 Kresina, T. F. and Miller, E. J.
Isolation and Characterization of Basement Membrane
Collagen from Human Placental Tissue. Evidence for
the Presence of Two Genetically Distinct Collagen
Chains
Biochemistry 18, 3089, 1979

- 56 Dixit, S. N.
Isolation and Characterization of Two α Chain Size
Collagenous Polypeptide Chains C and D from Glomerular
Basement Membrane
FEBS Let. 106, 379, 1979
- 57 Dixit, S. N.
Type IV Collagens: Isolation and Characterization of
Two Structurally Distinct Collagen Chains from
Bovine Kidney Corteces
Eur. J. submitted
- 58 Sage, H., Woodbury, R. G. and Bornstein, P.
Structural Studies on Human Type IV Collagen
J. Biol. Chem. 254, 9893, 1979
- 59 Timpl, R., Martin, G. R. and Bruckner, P.
Structure of Basement Membrane Collagen Obtained from
a Mouse Tumor
Front. Matrix Biol. 7, 130, 1979
- 60 Miller, E. J., Finch, E. J., Jr., Chung, E. and
Buttler, W. T.
Specific Cleavage of the Native Type III Collagen
Molecule with Trypsin
Arch. Biochem. Biophys. 173, 631, 1976
- 61 Reid, K. B. and Porter R. R.
Subunit Composition and Structure of Subcomponent C1q
of the First Component of Human Complement
Biochem. J. 155, 19, 1976

- 62 Trelstad, R. L., Catanese, V. M. and Rubin, D. F.
Collagen Fractionation: Separation of Native Types
I, II and III by Differential Precipitation
Anal. Biochem. 71, 114, 1976
- 63 Laemmle, U. K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of
the Head of Bacteriophage T4
Nature 227, 680, 1970
- 64 Edman, P. and Begg, G.
A Protein Sequenator
Eur. J. Biochem. 1, 80, 1967
- 65 Fietzek, P. P. and Kühn, K.
Automation of the Sequence Analysis by Edman Degradation
of Proteins and Peptides
in: Fortschritte der chemischen Forschung 29 (Topics in
Current Chemistry), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-
New York, 1972
- 66 Spiro, R. G.
The Structure of the Disaccharide Unit of the Renal
Glomerular Basement Membrane
J. Biol. Chem. 242, 4813, 1967
- 67 Askenasi, R. S. and Kefalides, N. A.
Simple Chromatographic Method for Determination of
¹⁴C-labeled Lysin, Hydroxylysin, and Hydroxylysin
Glycosides
Anal. Biochem. 47, 67, 1972

- 68 Odell, V., Wegener, L., Peczon, B. and Hudson, B.E.
A Rapid Automatic Analysis of Hydroxylysin, Hydroxyly-
sin Glycosides, and Methionin Sulphoxide in Collagen
and Basement Membrane
L. Chromatogr. 88, 245, 1974
- 69 Timpl. R.
Persönliche Mitteilung

LEBENS LAUF

Anton Rauter

Geboren am 18. Januar 1948 in Kaning, Österreich

Eltern: Anton Rauter und Bernadette Rauter

Schulbildung

1954	-	1958	Volksschule
1958	-	1963	Hauptschule
1963	-	1968	Höhere Technische Bundeslehranstalt
18. 6. 1968			Reifeprüfung
1969	-	1974	Technische Hochschule in Graz
			Diplomstudium der Studienrichtung Technische Chemie; Studienzweig Biochemie und Lebensmittelchemie
13. 6. 1972			Erste Staatsprüfung
28. 6. 1974			Diplomprüfung
1977	-	1979	Ludwig-Maximilians-Universität München
			Fakultät: Chemie und Pharmazie
			Studiengang: Promotion Chemie
1977	-	1979	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; Abteilung Binde- gewebeforschung, Leiter Prof. Dr. K. Kühn
1975	-	1977	Anstellung in der Industrie
			Pharmazell-Diamalt AG, München
1968	-	1969	Wehrdienst

